

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
Y
ESPECIALIDADES MÉDICAS



APOPTOSIS LINFOCITARIA Y EFECTO INMUNOMODULADOR
DEL INTERFERÓN BETA EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

TESIS DOCTORAL

HUGO BARCENILLA RODRÍGUEZ

2013

ALCALÁ DE HENARES, 2013
UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
Y
ESPECIALIDADES MÉDICAS



**APOPTOSIS LINFOCITARIA Y EFECTO INMUNOMODULADOR DEL
INTERFERÓN BETA EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

TESIS DOCTORAL

Hugo Barcenilla Rodríguez

DIRECTORES DE TESIS

Melchor Álvarez de Mon Soto,
Catedrático de Medicina,
Departamento de Medicina y Especialidades Médicas, Universidad de Alcalá.

Alfredo Prieto Martín,
Profesor Contratado Doctor,
Departamento de Medicina y Especialidades Médicas, Universidad de Alcalá.

David Díaz Martín,
Profesor Visitante,
Departamento de Medicina y Especialidades Médicas, Universidad de Alcalá.

A mis padres, a Yolanda y a MeiMei

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha desarrollado en un complejo ecosistema al que, para abreviar, llamaremos simplemente “el labo”. Todos los organismos que lo habitan han influido de una u otra manera en el éxito evolutivo de esta tesis doctoral y merecen, por tanto, mi agradecimiento.

En primer lugar dar las gracias a Melchor Álvarez de Mon, pues entre sus innumerables ramas, dejó pasar el rayo de luz que dio origen a este estudio. Gracias por la confianza depositada en mí y por mantener, con gran sentido del humor, una actitud proactiva.

Mi eterno agradecimiento a Alfredo Prieto, gurú y amigo, una de las especies más adaptables de este peculiar ecosistema y una de las mejores personas que he conocido. Sin tu ayuda no hubiera sido posible la supervivencia en este inhóspito paraje. Gracias de corazón.

El último de esta terna no es, de ninguna manera, el menos importante pues es un buen ejemplo de coevolución. David Díaz ha sido y será siempre mi maestro, un organismo con el que he llegado a tener una relación simbiótica. Cuando compartes un Cola Cao a altas horas de la noche, sabes que estás frente a un amigo. Gracias no solo por lo que hemos compartido, que fue más que una simple bebida de cacao, sino también por lo mucho que me has dado.

Dejando atrás las tres especies dominantes, y siguiendo siempre un orden aleatorio, me encuentro con el ser más humanizado. A Miguel Ángel debo agradecer los buenos momentos y la cantidad de frases que dejó en el recuerdo. Siempre estarás “in(put)”, aunque eso, ya sé que lo tienes muy claro.

El equilibrio del ecosistema no se podría haber mantenido sin los elementos formos del “rat team”. María, especie clave en la sostenibilidad del medio. A pesar de lo que dicen los test, es una excelente compañera, el haberte conocido me hace sentir como “el buey Apis” (aunque ese análisis sigue estando mal). MariaJo, estudiosa del cachalote cafetero, compañía imprescindible para reír a cualquier hora y la única capaz de hacer que me suba la...teína. Leticia, pocos saben que este organismo de risa contagiosa fue también mi profe, oye Leti (dígase con voz grave), mientras escribo esto salen dos de la peluquería.... Marga, que esconde tras un aura de tranquilidad, un buen humor que sacará más de una sonrisa. Y como no, Mónica, la gran esperanza para lo que nos queda de coco. Gracias a todas por vuestra simpatía.

En algún lugar de la cadena trófica se encuentran otras especies a las que es necesario dar las gracias. A Esther por los duros días de FA...digo FF. A Eduardo, por tener elegancia incluso cuando termina algo con esa frase tan característica que comienza igual que el inicio de esta. A Pepe, el pirata más divertido, por las lágrimas que he derramado con cada historia suya. A Juan, el tigre, capaz de hacer pasar hasta al más m...malvado. A las nuevas “fosfochachas”, Mercedes y Carolina, sangre fresca para los depredadores. A Jorge, que no da una pelota por perdida en *paddle*.

Mi agradecimiento a los que han contribuido a enriquecer la biodiversidad, Leo, que soportó mi compañía durante horas de laboratorio e interminables ELISAs, el friki tecnológico Martín, los maestros Lucho y Julio, Will, Natalia y el resto de “Cervantes” que habitaron el labo.

Cuando llega el otoño y las hojas caídas se acumulan, se necesita la intervención de M^a José para arreglar esas cosicas, y de Maribel y Laura, siempre disponibles cuando hace falta. Gracias por ayudarme donde yo me pierdo.

No puedo olvidarme de otras especies que ya se extinguieron como Sonia, Paz, Guille (y su postergay), Ana Belén, Elisa, Perucha y tantas otras que dejaron su huella en el lodo (y su aroma a Nenuco en el aire). Debo dar las gracias también a Petunia y Lumpykiller (y a sus ocho apóstoles), al Conde (fuente de inspiración) y, sobre todo, al gremlin que sabotea aparatos y hace que desaparezcan tantas cosas...

Por último, me gustaría mostrar mi agradecimiento a otras personas que, sin formar parte del labo, también influyeron de alguna manera en la elaboración de este trabajo.

A Marina, que me enseñó que no hay que perder la esperanza tras un experimento “catrasca”, a María del Puerto, una bella persona siempre dispuesta a ayudar y a Cheri, alegre compañera. Gracias por esos días que pasé en Londres.

A mis profesores, Yang Ming, Zhang Peng, Chen Siyuan y Mariana Liu, 感谢你们教我那么多. A la gente de la “二外”, Alejandro, Vitaly, Satoko, Jae, Alyona y Zhao Minli.

A mis amigos y amigas (¿Dónde están mis amigos?), Iván, Alberto, Sito, Álvaro, Sergio (Carpio), Sergio (Naves), Jose (Fili), Gustavo, Juli, Erica, Vero, Raquel, Begoña, Nuria, Noemí...a Pilar.

A Toñi y Sebas, por su apoyo y simpatía.

A mis padres, a los que debo todo, verdaderos responsables de esta tesis.

A mis hermanos Arantxa, Bea, Fer y Amanda, que tanto han tenido que sufrirme.

A MeiMei mi fiel compañera y a Grande y Pequeña, insaciables correctoras.

A Yolanda, mi inseparable camarada con la que he compartido tantas y tantas aventuras...

ÍNDICE

SUMMARY

ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN

1.- El Sistema inmune. Tolerancia inmunológica	3
1.1.- Mecanismos de tolerancia	5
1.1.1.- Tolerancia central en linfocitos T	6
1.1.2.- Tolerancia periférica en linfocitos T	7
1.1.3.- Tolerancia central en linfocitos B	9
1.1.4.- Tolerancia periférica en linfocitos B	9
2.- Esclerosis múltiple	10
2.1.- Epidemiología de la esclerosis múltiple	10
2.2.- Cursos clínicos de evolución de la esclerosis múltiple	11
2.3.- Mecanismos etiopatogénicos de la esclerosis múltiple	11
2.3.1.- Susceptibilidad genética	12
2.3.2.- Microorganismos	12
2.4.- Células implicadas en la patogenia de la esclerosis múltiple	14
2.2.1.- Linfocitos T	14
2.2.2.- Linfocitos B	15
2.5.- Tratamiento de la esclerosis múltiple. Mecanismos de acción del interferón beta	16
2.5.1.- Efectos del interferón beta en la activación y proliferación de células T	17
3.- Apoptosis	18
3.1.- Características de la apoptosis	19
3.2.- Vías de inducción de apoptosis	21
3.2.1.- Vía intrínseca o mitocondrial	21
3.2.2.- Vía extrínseca o de los receptores de muerte	22
JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	25
PACIENTES Y MÉTODOS	31
1.- Pacientes de esclerosis múltiple y controles sanos	33
2.- Obtención de las muestras biológicas	34
3.- Obtención de células mononucleares de sangre periférica	34
4.- Recuento y estudio de viabilidad celular	35

5.- Estudio de inmunofenotipo	35
6.- Cultivos celulares para la medida de apoptosis	36
7.- Determinación de células apoptóticas mediante anexina-v	37
8.- Determinación de células apoptóticas mediante extracción de ADN de bajo peso molecular	38
9.- Determinación de formas activas de caspasas	39
10.- Ensayos de bloqueo de la ruta de muerte dependiente de Fas	40
11.- Cálculo del número absoluto de células por citometría de flujo	40
12.- Cálculo del porcentaje de células apoptóticas	42
13.- Métodos estadísticos	44
RESULTADOS	45
1.- Características demográficas y clínicas de los pacientes de esclerosis múltiple	47
2.- Distribución de poblaciones de linfocitos de sangre periférica de pacientes con esclerosis múltiple	48
3.- Estudio de la apoptosis en linfocitos de pacientes con esclerosis múltiple antes del tratamiento con interferón beta	49
3.1.- Determinación de apoptosis mediante anexina-v en pacientes con esclerosis múltiple sin tratar con interferón beta	49
3.1.1.- Proporción de células apoptóticas en PBMCs frescos	50
3.1.2.- Proporción de células apoptóticas en cultivo	52
3.1.3.- Proporción de células apoptóticas en relación al número de células sembradas	60
3.2.- Determinación de apoptosis mediante extracción de ADN de bajo peso molecular en pacientes con esclerosis múltiple sin tratar	64
3.3.- Estudio de caspasas activas en linfocitos T de pacientes con esclerosis múltiple	66
3.4.- Estudio de expresión y bloqueo de Fas (CD95)	68
4.- Estudio de la apoptosis en linfocitos de pacientes con esclerosis múltiple durante el tratamiento con interferón beta	69
4.1.- Efecto del tratamiento con interferón beta en la apoptosis de los linfocitos T de pacientes con esclerosis múltiple	70
4.2.- Estudio de la apoptosis espontánea en pacientes con brotes clínicos durante el tratamiento con interferón beta	75
DISCUSIÓN	77
CONCLUSIONES	89

1. Prieto A, Díaz D, Barcenilla H, Castrillo C, Monserrat J, Merino AG, Alvarez-Mon M; GENIO II-group. Increased spontaneous ex vivo apoptosis and subset alterations in peripheral blood T cells from patients with multiple sclerosis. **J Clin Immunol** 2006 Mar;26(2):101-12.
2. García-Merino A, Barcenilla H, Díaz D, Monserrat J, Prieto A, Alvarez-Mon M; Genio II group. IFNbeta therapy progressively normalizes the increased ex vivo T lymphocyte apoptosis observed in active patients with multiple sclerosis. **Clin Immunol** 2009 Aug;132(2):195-202.

SUMMARY

Background: Multiple sclerosis (MS) is a chronic demyelinating disease characterized by the presence of inflammatory cells in the central nervous system. Although the primary cause of MS is yet unknown, there are evidences that T and B lymphocytes play a pathogenic role in the development of the disease. The efficacy of IFN β in the treatment of MS has been demonstrated but its mechanism of action remains unclear. There are few studies evaluating the role of IFN β in the regulation of apoptosis of lymphocytes in MS and their results are contradictory. However, the real incidence of this cell death has not been determined.

The objective of this work was to determine the apoptosis of peripheral blood lymphocytes from untreated patients with MS and evaluate its regulation during IFN β therapy.

Methods: Peripheral blood mononuclear cells were isolated from patients with MS and healthy controls and the apoptosis of lymphocytes was measured after 24 hours of culture by three independent methods: annexin-V binding determination, low molecular weight DNA extraction and active forms of caspases detection. A follow-up study of the incidence of apoptosis was performed at 0, 1, 6 and 12 months of treatment with IFN β .

Results: T lymphocytes, but not B lymphocytes, from untreated patients with MS showed higher percentages of apoptotic cells than those from healthy controls. This increment was more pronounced in those patients who suffered more than 2 MS attacks in the 2 years before the study. IFN β therapy induced a significant reduction in the proportion of T cells undergoing apoptosis, reaching normal values after 12 months of treatment. However, a transient increase in the percentages of apoptotic cells was observed during MS attacks in those patients who suffered MS attacks despite IFN β therapy.

Conclusions: The susceptibility to undergo apoptosis is increased in T lymphocytes from patients with MS. This increment of apoptosis is related to the activity of the disease and is normalised after 12 months of IFN β therapy.

ABREVIATURAS

AICD: muerte celular inducida por activación
AIRE: regulador autoinmune
APC: alofococianina
APCs: células presentadoras de antígeno
BAFF: factor de activación de células B
BCR: receptor de células B
BHE: barrera hematoencefálica
CTLA-4: antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico
DED: dominio efector de muerte
DISC: complejo de señalización inductor de muerte
EAE: encefalitis alérgica experimental
EBV: virus de Epstein-Barr
EDSS: escala expandida del estado de discapacidad
EEM: error estándar de la media
EM: esclerosis múltiple
EMRR: esclerosis múltiple remitente-recidivante
EMSP: esclerosis múltiple progresiva secundaria
FADD: dominio de muerte asociado a Fas
FITC: isotiocianato de fluoresceína
FLICA: inhibidores de caspasas marcados con fluorocromo
HHV: herpesvirus humano
IFN β : interferón beta
IFN γ : interferón gamma
MHC: complejo mayor de histocompatibilidad
PBMCs: células mononucleares de sangre periférica
PE: ficoeritrina, phycoerythrin
PerCP: conjugado de proteína clorofil peridina
PHA: fitohemaglutinina
PI: yoduro de propidio
PS: fosfatidil serina
SNC: sistema nervioso central

sVCAM-1: molécula de adhesión de células vasculares 1 soluble

TCR: receptor de células T

TLRs: receptores de tipo toll

INTRODUCCIÓN

1. EL SISTEMA INMUNITARIO. TOLERANCIA INMUNOLÓGICA

El sistema inmunitario constituye una compleja red estructural y funcional de múltiples células y moléculas cuya característica biológica esencial es la capacidad de reconocimiento específico por medio de constantes interacciones entre sus componentes con los restantes del organismo y con los posibles elementos extraños que puedan penetrar en el cuerpo humano (Janeway CA, 2005). La capacidad de reconocimiento antígeno específico y de desarrollo de una respuesta efectora concede al sistema inmunitario una importante función defensiva frente a la agresión por componentes extraños no propios, como microorganismos, o la transformación neoplásica de células propias.

Se pueden diferenciar dos tipos de respuestas inmunes, innata y adaptativa, que tienen mecanismos diversos y heterogéneos aunque existe una interrelación complementaria entre los dos tipos de respuestas y sus componentes. La respuesta inmune innata comprende los mecanismos de defensa presentes incluso antes de que se produzca la infección y están preparados para responder inmediatamente ante ésta. La respuesta inmune innata es inespecífica por lo que será esencialmente la misma ante infecciones repetidas (Abbas AK, 2004). Los principales componentes de la respuesta inmune innata son 1) barreras físicas y químicas; 2) células exocíticas (mastocitos, eosinófilos, basófilos), células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos y células dendríticas) y células citolíticas (células NK); 3) componentes del sistema del complemento y otros mediadores de inflamación; 4) citoquinas. La respuesta inmune innata se da frente a estructuras comunes a microorganismos relacionados y aunque difiere frente a grandes grupos de patógenos (virus, bacterias gram positivas, bacterias gram negativas), es incapaz de distinguir diferencias sutiles entre distintos patógenos.

La respuesta inmune adaptativa se activa cuando un patógeno evade los primeros mecanismos de defensa y genera unos niveles de antígeno que permiten su transporte a los órganos linfoides secundarios y su presentación a los linfocitos T (Janeway CA, 2005). Es una respuesta con una alta especificidad que es capaz de distinguir entre moléculas y microorganismos diferentes incluso cuando están muy relacionados. La respuesta inmune adaptativa además, se intensifica tras exposiciones repetidas de un mismo antígeno. Sus

componentes son los linfocitos T y B y las moléculas liberadas por estas células tras su activación, las citoquinas, las citotoxinas y los anticuerpos.

El componente celular del sistema inmunitario está constituido por los linfocitos, monocitos, mastocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos y células dendríticas. El progenitor mieloide es el precursor común de granulocitos, macrófagos, células dendríticas y mastocitos. Los monocitos circulan por la sangre y se diferencian continuamente en macrófagos tras migrar a los tejidos. Las células dendríticas están especializadas en captar antígenos, procesarlos y presentarlos a los linfocitos. Los mastocitos también se diferencian en los tejidos y cuando se activan liberan moléculas proinflamatorias que aumentan permeabilidad vascular.

Los granulocitos se denominan así porque tienen gránulos que se tiñen intensamente en su citoplasma; también se les denomina leucocitos polimorfonucleares por la forma irregular de su núcleo. Los granulocitos presentan una vida media relativamente corta y son producidos en grandes cantidades durante las respuestas inmunes, en el curso de las cuales abandonan el torrente sanguíneo para migrar a los focos de infección o inflamación. Los neutrófilos, que constituyen el tipo de célula fagocítica del sistema inmunitario más abundante en sangre, son el componente más numeroso e importante en la respuesta inmune innata. Los eosinófilos son esencialmente importantes en la respuesta contra parásitos. La función de los basófilos es probablemente similar y complementaria a la de los eosinófilos y mastocitos.

El progenitor linfoide común genera los linfocitos y las células asesinas naturales o espontáneas (natural killer cells, NK cells). Existen dos tipos de linfocitos: los linfocitos B, que una vez activados se diferencian en células plasmáticas que secretan anticuerpos; y los linfocitos T que se dividen en dos clases principales; una de ellas, se diferencia tras su activación en células T citotóxicas que matan células infectadas por virus, la otra clase, los linfocitos T cooperadores, se diferencia a células que cooperan con otros tipos celulares como las células B y los macrófagos. Los linfocitos T y B pueden además diferenciarse en células memoria que generan respuestas más intensas y más rápidas a las exposiciones siguientes de un mismo antígeno. Las células NK carecen de receptores específicos de antígeno y forman parte de la respuesta inmune innata.

1.1. MECANISMOS DE TOLERANCIA

Una de las características más importantes del sistema inmunitario es la capacidad de discriminar los antígenos propios de los extraños. Todos los individuos sanos son tolerantes frente a sustancias propias potencialmente antigénicas, este fenómeno se conoce como tolerancia y el fallo de ésta, es la causa fundamental de la autoinmunidad.

Los linfocitos reconocen a los antígenos a través de receptores específicos. Estos son los receptores de células T (TCR) en los linfocitos T y los anticuerpos que se expresan en la superficie de los linfocitos B como receptores de células B (BCR). La enorme diversidad de estos receptores se consigue por dos procesos de modificación somática 1) la recombinación somática que forma genes únicos para cada una de las cadenas de estos receptores a partir de la recombinación de tres segmentos génicos diferentes durante la diferenciación de linfocitos T o B en los órganos linfoides primarios y 2) la hipermutación somática que sustituye nucleótidos de la región hipervariable del BCR durante una fase tardía de la respuesta inmune en los órganos linfoides secundarios. El porcentaje de BCRs o de TCRs que se unen a antígenos propios después de la recombinación somática es de un 20 a un 50 por ciento (Zerrhan J, 1997; Laufer TM, 1996; Wardemann H, 2003) por lo que todos los individuos producen células autorreactivas, sin embargo, sólo de un 3 a un 8 por ciento de la población desarrolla una enfermedad autoinmune (Jacobson DL, 1997) lo que indica la existencia de mecanismos de inducción de tolerancia.

La tolerancia puede inducirse en los órganos linfáticos primarios como consecuencia del reconocimiento de antígenos propios por parte de linfocitos autorreactivos inmaduros, lo que se conoce como tolerancia central, o en los tejidos periféricos como resultado del encuentro de los antígenos propios con linfocitos autorreactivos ya maduros en unas condiciones determinadas de ausencia de señales coestimulatorias, lo que se denomina tolerancia periférica (Abbas AK, 2004).

1.1.1. TOLERANCIA CENTRAL EN LINFOCITOS T

Durante el desarrollo de los linfocitos T en el timo ocurren dos procesos que evitan la maduración de las células autorreactivas: el proceso de edición del TCR que tiene lugar después de la recombinación somática (Nemazee D, 2003) y la eliminación celular (Palmer E, 2003).

El TCR reconoce fragmentos de péptidos unidos a moléculas MHC. En la superficie de las células epiteliales de la corteza del timo se presentan moléculas MHC unidas a péptidos de antígenos propios, las células que reconocen estos complejos débilmente activan señales de maduración que inhiben los genes responsables de la recombinación (Palmer E, 2003) e incrementan el número de TCRs en la superficie celular. Algunas de estas células que reconocen antígenos propios activan un proceso de edición del TCR, sufren una nueva recombinación y sustituyen su TCR por otro menos autorreactivo.

Otras células que reconocen péptidos propios con alta afinidad en la corteza del timo reciben señales para expresar el factor de transcripción Foxp3 y se diferencian a células T reguladoras que serán capaces de suprimir la respuesta de células autorreactivas en la periferia (Jordan MS, 2001; Bensinger SJ, 2001).

Los linfocitos inmaduros pasan a la médula del timo donde tiene lugar el proceso más importante en la inducción de la tolerancia central. Las células epiteliales medulares y las células dendríticas presentan en su superficie complejos péptido propio-MHC y moléculas coestimuladoras que ayudan a la activación de las células autorreactivas. Los linfocitos inmaduros que se unen fuertemente a los complejos péptido propio-MHC sufren la eliminación celular por apoptosis aunque las señales que desencadenan este proceso todavía son desconocidas.

Una de las posibles limitaciones de este proceso de selección negativa es la dificultad que tienen las células medulares de presentar antígenos específicos de órganos periféricos, sin embargo, este problema se resuelve en parte gracias a la expresión del gen regulador autoinmune (AIRE). El producto de este gen es el responsable de la expresión ectópica en la médula tímica de algunos antígenos que se expresan en diferentes tejidos periféricos (Anderson MS, 2002; Liston A, 2003).

1.1.2. TOLERANCIA PERIFÉRICA EN LINFOCITOS T

Si el proceso de selección negativa que tiene lugar en la tolerancia central fuera demasiado estricto, habría un gran riesgo de reducir el repertorio disponible para responder a patógenos externos. Por tanto, es más rentable permitir que algunos linfocitos con cierto grado de autorreactividad pasen el control de la tolerancia central y sean regulados en otro lugar. En la periferia los linfocitos autorreactivos son controlados por mecanismos de inducción de anergia, eliminación o supresión.

A menudo se ha propuesto que la autoinmunidad es el resultado de un fracaso de los procesos de selección negativa en el timo. Sin embargo, muy pocos indicios formales sustentan esta hipótesis en cualquiera de las enfermedades autoinmunes experimentales o humanas, es posible que incluso en el caso de que estos procesos fracasasen, los mecanismos de tolerancia periférica sean suficientes para que las células no respondan a muchos autoantígenos, por lo tanto, la mayoría de las enfermedades autoinmunes se deben al fracaso en la tolerancia periférica (Abbas AK, 2004).

El linfocito maduro inicia un proceso de proliferación y diferenciación en respuesta al reconocimiento del antígeno, debido a este cambio, las células autorreactivas ya no pueden ser reguladas testando la afinidad de los receptores, este problema se resuelve considerando las condiciones del ambiente en las que se produce el reconocimiento del antígeno. Las células T novatas requieren una señal coestimuladora independiente del antígeno para diferenciarse a células efectoras (Lafferty KJ, 1975), esta señal es aportada por células presentadoras de antígeno (Antigen presenting cell, APC) que aumentan el número de moléculas de la familia B7 como CD80 y CD86. Estas moléculas coestimuladoras de la APC se unen al receptor CD28 de la célula T que reconoce el antígeno (Sharpe AH, 2002). Estas moléculas coestimuladoras sólo aumentan en la superficie de las APCs si estas detectan una señal de patógenos o de daño tisular (Matzinger P, 2002). Se ha observado que en respuesta al reconocimiento de patrones microbianos a través de los receptores tipo Toll (Toll-like Receptors, TLRs) las APCs se activan y aumentan el número de moléculas de la familia B7 (Janeway CA Jr, 2002). El reconocimiento de estas moléculas coestimuladoras potencia la supervivencia y la expansión clonal de las células T que reconocen el antígeno activando la vía NF- κ B1 e

induciendo la expresión de proteínas relacionadas con la supervivencia (Kane LP, 2002). Las APCs pueden presentar continuamente antígenos propios pero en ausencia de activación, la señal coestimuladora que reciben los linfocitos T autorreactivos es demasiado débil para producir una respuesta. Sin embargo, se ha observado que el bloqueo de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 inhibe la tolerancia en lugar de promoverla (Lane P, 1996), esto se debe a que la unión de estas moléculas con CTLA-4, un receptor homólogo a CD28 pero con función inhibidora (Krummel MF, 1995; Walunas TL, 1996), se requiere para la inducción de anergia *in vivo* (Perez VL, 1997; Walunas TL, 1998). CTLA-4 tiene mayor afinidad por CD80 y CD86 que CD28 por lo que cuando la cantidad de estas moléculas sobre la superficie de las APCs es baja, se produce la señalización a través de CTLA-4 lo que produce la anergia del linfocito. Cuando la cantidad de CD80 y CD86 aumenta se produce la coestimulación a través de CD28 que activa a la célula T que reconoce al antígeno.

Otra molécula que podría estar implicada en la inducción de anergia es PD-1 que se expresa en altas cantidades en las células T anérgicas (Lechner O, 2001). Esta molécula podría actuar inhibiendo la secreción de citoquinas, causando un arresto en el ciclo celular o induciendo apoptosis (Freeman GJ, 2000; Latchman Y, 2001).

Una de las maneras más eficaces de evitar el daño autoinmune producido por un determinado clon de linfocitos T es la eliminación de este clon por muerte celular inducida por activación (activation-induced cell death, AICD). Como los antígenos propios no se pueden eliminar, la estimulación repetida de los linfocitos que reconocen estos antígenos podría provocar AICD ya que la reestimulación induce en el linfocito la expresión del receptor de muerte Fas y de su ligando FasL cuya unión activa la vía extrínseca de apoptosis. Esta eliminación periférica normalmente no es completa y en muchos modelos las células restantes son anérgicas por lo que es posible que su función sea la de reducir la frecuencia de precursores hasta un nivel en el que la anergia pueda ser efectiva (Walter LS, 2002).

Algunas células T CD4⁺ autorreactivas que escapan de la selección negativa en el timo, se diferencian, por un mecanismo desconocido, a un linaje diferente capaz de suprimir la activación de otras células autorreactivas. Estas células se conocen como linfocitos T reguladores y se caracterizan por la expresión constitutiva de CD25 y del factor de

transcripción Foxp3 (Asano M, 1996; Kronenberg M, 2005; Picca CC, 2005; Sakaguchi S, 2004)

1.1.3. TOLERANCIA CENTRAL EN LINFOCITOS B

Al igual que los linfocitos T, los linfocitos B inmaduros testan la afinidad de su receptor, el BCR, durante su desarrollo en la médula ósea. Cuando el receptor se une con mucha afinidad, la célula B inmadura internaliza rápidamente el receptor y detiene el programa de maduración (Hartley SB, 1993). El receptor CD62L, necesario para la entrada en los nódulos linfáticos, no se expresa, el receptor para el factor de activación de células B (BAFF), citoquina necesaria para la supervivencia de las células B en la periferia, apenas se induce (Mackay F, 2003) y los genes responsables de la recombinación somática, RAG1 y RAG2 continúan expresándose lo que permite la edición del BCR que sustituye la cadena ligera (Jankovic M, 2004). Si esto falla y no se consigue un receptor con menor afinidad el linfocito inmaduro muere en uno o dos días en la médula ósea o en el bazo (Hartley SB, 1993).

A diferencia de los linfocitos T, las células B que reconocen antígenos órgano específicos no pueden ser eliminadas en la médula ósea.

1.1.4. TOLERANCIA PERIFÉRICA EN LINFOCITOS B

En los linfocitos B maduros ocurren cambios bioquímicos intrínsecos que llevan a un estado anérgico a aquellas células que expresan un receptor autorreactivo. Estos cambios incluyen la expresión constitutiva de proteínas que aumentan el umbral de activación de la célula (Ravetch JV, 2000) y la reducción en la expresión del receptor debido a una endocitosis acelerada y al bloqueo del transporte de nuevos receptores a la membrana celular (Bell SE, 1994).

Otro mecanismo de regulación de las células B autorreactivas con receptores de afinidad intermedia es a través de la competencia con otras células B (Cyster JG, 1994; Thien M, 2004). El reconocimiento de antígenos propios en la médula ósea con una afinidad menor que el umbral necesario para detener la maduración de las células B, es suficiente para

incrementar la cantidad necesaria de BAFF que necesita la célula para sobrevivir, en condiciones normales, las células que reconocen antígenos propios en la periferia no reciben suficiente BAFF por lo que son eliminadas.

2. ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta al sistema nervioso central (SNC). La lesión característica consiste en la desmielinización del SNC asociada a un infiltrado inflamatorio perivascular. La enfermedad fue descrita en 1868 con el término de esclerosis en placas (Charcot JM, 1868). Se produce principalmente a principios de la edad adulta con características de exarcebaciones y remisiones. Los síntomas de la EM son muy diversos y pueden ir desde temblor y parálisis hasta trastornos del habla y de la visión.

2.1. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La EM es la enfermedad neurológica crónica más frecuente (Smith C, 1995), la prevalencia de la EM es mayor en países de climas fríos, en el norte de Europa y Estados Unidos se superan los 100 casos por cada 100.000 habitantes. La prevalencia es más baja en países árabes, Sudamérica y Japón.

La prevalencia en España es similar a la de otros países mediterráneos y de clima templado con unas cifras en torno a los 50 casos por 100.000 habitantes.

La incidencia máxima está alrededor de los 30 años y declina posteriormente siendo muy poco frecuente el inicio después de los 60 años.

La EM es más frecuente en mujeres con un ratio mujer/hombre entre 1,4 y 3,1 (Hader WJ, 1988).

2.2. CURSOS CLÍNICOS DE EVOLUCIÓN DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

En la EM se pueden distinguir cuatro cursos clínicos (Lublin FD, 1996):

- **Esclerosis Múltiple Remitente-Recidivante:** Se caracteriza por la aparición de brotes clínicos seguidos de una remisión total o parcial de los síntomas. Es la forma clínica más frecuente, está presente en el 85% de los pacientes.
- **Esclerosis Múltiple Progresiva Primaria:** La enfermedad evoluciona progresivamente sin la aparición de brotes. La presentan un 10-15% de los pacientes.
- **Esclerosis Múltiple Progresiva Secundaria:** Se caracteriza por una evolución progresiva de la enfermedad que puede tener brotes intercalados y que aparece tras una fase remitente-recidivante. Hasta un 50% de los pacientes pueden evolucionar hasta esta forma.
- **Esclerosis Múltiple Progresiva-Recidivante:** En este curso los pacientes evolucionan progresivamente pudiendo sufrir brotes a lo largo de la enfermedad.

2.3. MECANISMOS ETIOPATOGÉNICOS DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

A pesar de que numerosas investigaciones están enfocadas en determinar la secuencia de eventos que desencadenan la inflamación característica de la EM, todavía no se conoce el mecanismo etiopatogénico de la enfermedad. La pérdida de integridad de la barrera hematoencefálica (BHE) en una persona genéticamente predispuesta parece ser un evento crucial en la patogénesis de la EM. Existen hipótesis que sugieren que algunas infecciones sistémicas pueden causar el aumento de moléculas de adhesión en el endotelio vascular del cerebro y médula espinal permitiendo a los leucocitos entrar al SNC. Si dentro de estas células infiltrantes existen células reactivas frente a antígenos de mielina, se puede inducir una cascada de eventos que resultarían en la formación de la placa inflamatoria (Raine CS, 1994). Estas lesiones se originan normalmente en la materia blanca aunque también se conocen lesiones en la materia gris (Geurts JJ, 2005).

2.3.1. SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA

El papel de la genética en la susceptibilidad de la EM es complejo. Existen datos epidemiológicos en familias que sugieren que la EM no es una enfermedad asociada a un solo gen. Además, el factor ambiental también contribuye al desarrollo de la enfermedad (Dyment DA, 2002). La mayor evidencia de la contribución genética en el desarrollo de la EM viene de estudios en familias con gemelos (Ebers JC, 1986). El riesgo de contraer EM incrementa con el grado con el que se comparte información genética dentro de una familia.

Algunas de las mayores asociaciones con la EM se han encontrado en genes del complejo HLA-II en particular HLA-DR15Dw2 y HLA-DQw6 (Compston A, 2000). Estudios multigeneracionales en familias con quince miembros con EM han propuesto la existencia de un locus responsable de la susceptibilidad a EM con HLA-DRB1 como modificador importante (Dyment DA, 2002). Hay un estudio limitado a una población que sugieren un mayor riesgo en el haplotipo DRB1*15-DQB1*0602 y un efecto protector del haplotipo DRB1*13-DQB1*0603 (Laaksonen M, 2002).

Otros genes asociados a la susceptibilidad al desarrollo de EM son el gen que codifica la cadena alfa del receptor de IL7 (Gregory SG, 2007; Lundmark F, 2007) y el gen que codifica la cadena alfa del receptor de IL2 (Akkad DA, 2009; Lowe CE, 2009).

2.3.2. MICROORGANISMOS

Varios estudios han propuesto la existencia de una asociación entre la aparición de episodios de EM y la presencia de infecciones virales o microbianas. Se piensa que algunos antígenos presentes en estos organismos infecciosos podrían mimetizar los autoantígenos de la EM (Soldan S, 1997; Cirone M, 2002). Esta posible asociación se basa en 1) estudios epidemiológicos de exposición a agentes infecciosos durante la infancia y aumento de brotes clínicos durante infecciones virales 2) asociación geográfica de susceptibilidad a EM 3) evidencia de que la migración a o desde lugares de alto riesgo tiene influencia en la posibilidad de desarrollo de EM 4) respuesta inmune

anormal frente a una variedad de virus y 5) analogía con modelos animales u otras enfermedades humanas en las que los virus pueden causar enfermedad después de largos periodos de incubación.

Uno de los posibles agentes etiológicos es el herpesvirus humano (human herpesvirus, HHV). Se ha encontrado HHV-6 y HHV-8 en placas activas de EM (Soldan S, 1997; Merelli E, 1997), además, los HHVs son buenos candidatos por diversas razones: 1) los HHVs son muy neurotrópicos 2) la capacidad que tienen los HHVs de reactivarse, los factores que influyen en esta reactivación también se han asociado con los brotes clínicos de la EM 3) el HHV puede infectar células tanto del sistema inmunitario como del sistema nervioso lo que podría explicar que causara anomalías en ambos (Soldan S, 1997; Merelli E, 1997).

Debido a la similitud antigénica entre algunas bacterias o virus y otros tejidos se puede producir un daño indirecto en tejidos normales durante la eliminación de agentes infecciosos, por ejemplo, la similitud molecular del virus HHV-6 con antígenos de mielina puede permitir una reacción cruzada, de este modo, los linfocitos T activados por el virus cruzarían la BHE y en algunas personas predispuestas identificarían antígenos de mielina normales como antígenos virales lo que provocaría el daño tisular (Mason D, 1998).

El virus de Epstein-Barr (Epstein-Barr Virus, EBV) es otro virus de la familia de los herpesvirus propuesto como agente etiológico. Este virus está implicado en todos los casos de EM (Pender MP, 2003) y se han encontrado células B infectadas por este virus en el cerebro en casos de EM (Serafini B, 2007). Se han propuesto varias hipótesis para explicar el papel del EBV en el desarrollo de la EM como la reacción cruzada (Lang HL, 2002), el daño causado en el SNC como consecuencia de la reacción frente al EBV (Serafini, 2007), la respuesta de linfocitos T frente a una proteína de choque térmico acumulada en los oligodendrocitos tras la infección con EBV (Van Noort JM, 2000) y la infección de células B autorreactivas que generarían autoanticuerpos y proveerían señales coestimuladoras a células T autorreactivas (Pender MP, 2003; Pender MP, 2011).

Otros patógenos que podrían estar implicados en el desarrollo de la EM son aquellos que son capaces de estimular TLRs, estos receptores son importantes para la producción de

interleuquinas como la IL-12 y la IL-23 que conducen a la activación de células autorreactivas (Waldner H, 2004; Deng C, 2003).

Algunos agentes infecciosos pueden tener también un papel importante en la interacción de las células T con el endotelio cerebrovascular aumentando la expresión de moléculas de adhesión importantes para el reclutamiento de células inmunes en el sistema nervioso central (Kerfoort SM, 2004).

Es poco probable que la acción de algunos microorganismos como el virus HHV-6 sea la causa principal de la EM pero una exposición temprana a ciertos microorganismos puede ser importante para el desarrollo de la EM.

2.4 CÉLULAS IMPLICADAS EN LA PATOGENIA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

2.4.1. LINFOCITOS T

Varios estudios en modelos animales de EM han demostrado que las células T reactivas frente antígenos propios de mielina pueden causar una desmielinización inflamatoria del SNC (Pettinelli CB, 1981; Ando DG, 1989; Huseby ES, 2001). El número de células que reaccionan frente a mielina en sangre periférica de los pacientes de EM no se diferencia del de personas sanas pero si se han encontrado diferencias cualitativas. Las células T específicas de mielina de los pacientes con EM presentan un fenotipo activado o memoria mientras que en personas sanas tienen un fenotipo novato (Lovett-Racke, 1998). Existen también diferencias en la secreción de citoquinas y en la expresión de quimiorreceptores que sugieren una mayor capacidad inflamatoria de las células reactivas frente a mielina de los pacientes con EM (Kivisakk P, 2004; Zang YC, 2004). Se piensa que las enfermedades autoinmunes órgano-específicas como la EM están mediadas por células Th1 que producen interferón γ (IFN γ , Ando DG, 1989). La producción de citoquinas de las células T reactivas frente a mielina de pacientes de EM es más consistente con una respuesta Th1 mientras que las células T específicas de mielina de personas sanas tienden a producir citoquinas propias de una respuesta Th2 (Crawfor MP, 2004).

Algunas citoquinas de la familia de la IL-12 tienen un papel regulador de la respuesta de linfocitos T que puede tener importancia en la EM (Trinchieri G, 2003). En modelos animales de EM, las posibilidades de desarrollo de la enfermedad dependen de las citoquinas que se encuentran funcionales, en ratones con deficiencia de IL-12 e IL-23 la enfermedad no se desarrolla, sin embargo, cuando únicamente hay una deficiencia de IL-12 se produce una desmielinización severa (Zhang GX, 2003). Los ratones deficientes de IL-23 son resistentes a la enfermedad y mantienen una respuesta Th1 normal.

Uno de los efectos conocidos de la IL-23 es la inducción de la producción de IL-17 por células T (Wilson NJ, 2007), en estudios de microarray de lesiones de pacientes de EM se ha determinado un aumento en la expresión de esta citoquina por lo que se piensa que podría tener un papel importante en la inflamación de la EM (Lock C, 2002).

Otro tipo de células T que podrían tener importancia en el desarrollo de la EM son las células T reguladoras, se ha observado una deficiencia en la funcionalidad de estas células en pacientes de EM (Viglietta V, 2004).

2.4.2. LINFOCITOS B

Hay varias evidencias de la posible implicación de los linfocitos B en el desarrollo de la EM, estas incluyen: 1) el nivel elevado de inmunoglobulina en líquido cefalorraquídeo 2) la presencia de bandas oligoclonales en electroforesis en gel de azarosa y 3) la presencia de células plasmáticas y anticuerpos en las lesiones (Antel J, 1999; Archelos JJ, 2000; Cross AH, 2001; Villar LM, 2003; Villar LM, 2005)

En el SNC de pacientes de EM ocurre una respuesta de células B frente a un antígeno específico como demuestra la expansión clonal de células B y el aumento en la hipermutación somática de sus receptores en el líquido cefalorraquídeo de pacientes de EM (Owens GP, 2003; Qin Y, 1998). Dentro de estos clones de células B existen algunas células que han llevado a cabo un proceso de edición (Monson NL, 2005). Todavía queda por determinar qué antígenos del SNC reconocen los autoanticuerpos generados por las células B expandidas en los pacientes de EM.

2.5 TRATAMIENTO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE. MECANISMOS DE ACCIÓN DEL INTERFERÓN BETA

Se pueden distinguir tres tipos de tratamiento de la esclerosis múltiple: 1) el tratamiento específico de los numerosos síntomas asociados a la enfermedad, 2) el tratamiento de los brotes principalmente mediante dosis altas de glucocorticoides por vía intravenosa y 3) el tratamiento del curso de la enfermedad.

Entre los fármacos utilizados en el tratamiento del curso de la enfermedad se encuentran:

Azatioprina

El tratamiento con este inmunosupresor reduce las lesiones y la actividad de la enfermedad (Confavreux C, 1996; La Mantia L, 2007).

Acetato de glatirámico

El tratamiento con acetato de glatirámico reduce la frecuencia de los brotes y la progresión de la enfermedad en los pacientes de EMRR (Johnson KP, 2000).

Mitoxantrona

La mitoxantrona es un potente inmunosupresor que reduce la frecuencia de los brotes y la progresión de la enfermedad (Hartung HP, 2002).

Natalizumab

Este anticuerpo reconoce la subunidad $\alpha 4$ de la integrina $\alpha 4\beta 1$ con lo que bloquea la unión de esta integrina a VCAM-1. Esto inhibe la migración leucocitaria a través de la barrera hematoencefálica por lo que reduce la inflamación en el SNC. Reduce la frecuencia de los brotes y la progresión de la enfermedad (Hutchinson M, 2009).

Interferón beta

Otro de los fármacos utilizados en el tratamiento del curso de la enfermedad es el interferón beta (IFN β) en el que se centrará esta tesis. Se utiliza para el tratamiento de

EMRR y EMSP con exacerbaciones. El tratamiento temprano con IFN β reduce la frecuencia de los brotes y la severidad de la enfermedad (The IFNB Multiple Sclerosis Study Group, 1995; Goddin DS, 2002) y el desarrollo de las lesiones (Jacobs LD, 2000; Comi G, 2001). Los efectos en el sistema inmune del IFN β que son beneficiosos en el tratamiento de la MS no son del todo conocidos pero se piensa que podría incluir la reducción de la activación de células T, la inducción de un cambio en la secreción de citoquinas a favor de un efecto anti-inflamatorio y la prevención de la adhesión y extravasación a través de la barrera hematoencefálica.

2.5.1 EFECTOS DEL IFN β EN LA ACTIVACIÓN Y PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS T

El IFN β inhibe la activación y proliferación de células T de varias maneras. Primero reduciendo la expresión de moléculas MHC de clase II y moléculas coestimuladoras por lo que el IFN β interfiere en la presentación de antígeno necesaria para la activación de los linfocitos T (Jiang H, 1995). Además previene la interacción B7/CD28 y CD40/CD40L con lo que reduce la activación de células T reactivas frente a mielina (Genç K, 1997; Teleshova N, 2000).

El IFN β puede además mediar en la actividad del receptor de quimioquina CCR7, una molécula crucial en el direccionamiento de los linfocitos T a los nódulos linfáticos periféricos. El IFN β aumenta los niveles de CCR7 en la superficie de las células T, de esta forma, el IFN β parece conducir a las células autorreactivas a tejidos linfoides secundarios en lugar de a los sitios de inflamación del sistema nervioso central (Vallittu AM, 2007).

Efectos del IFN β en el balance de citoquinas

El IFN β reduce la expresión de citoquinas Th1 como el IFN γ o la IL-12 mientras que potencia las respuestas antiinflamatorias Th2 (Wang X, 2000). El IFN β es capaz de inhibir los efectos de IL-12 tanto en células mononucleares de sangre periférica como en

células T reactivas frente a proteína básica de mielina de una manera dependiente de IL-10 (Wang X, 2000). Se ha observado un aumento en los niveles de IL-10 en pacientes respondedores a la terapia con IFN β mientras que en pacientes no respondedores los niveles de IL-10 se reducen respecto al comienzo de la terapia (Graber JJ, 2007).

Efectos del IFN β en la barrera hematoencefálica

Se han propuesto dos mecanismos para explicar la actuación del IFN β en la barrera hematoencefálica. Primero, el IFN β puede prevenir la adhesión de las células T al endotelio y segundo, podría prevenir la extravasación leucocitaria al sistema nervioso central.

El primer mecanismo estaría mediado por el aumento de la concentración en suero de la molécula de adhesión de células vasculares 1 soluble (sVCAM-1) durante el tratamiento con IFN β . Este aumento de sVCAM-1 podría bloquear la adhesión de leucocitos al endotelio uniéndose de manera competitiva a la integrina VLA-4 (Graber JJ, 2005).

En cuanto al segundo mecanismo, se ha observado que el IFN β aumenta la expresión vascular de CD73, una enzima presente en las células endoteliales y linfocitos de sangre periférica y es responsable de la producción de adenosina, un nucleótido con efectos antiinflamatorios y neuroprotectores en la encefalitis alérgica experimental (EAE), modelo animal de la EM (Airas L, 2007). Induciendo la expresión de CD73, el IFN β puede mejorar la función de la barrera endotelial por lo que puede prevenir la transmigración de leucocitos y otros mediadores neurotóxicos a través de la barrera hematoencefálica a los sitios de inflamación en el SNC (AirasL, 2007; Niemelä J, 2008).

3. APOPTOSIS

La muerte celular programada o apoptosis es actualmente una de las áreas más investigadas de la biología moderna. La apoptosis es un modo de muerte activa y fisiológica codificada genéticamente y caracterizada por encogimiento celular, fragmentación de proteínas, condensación de la cromatina y degradación del DNA, que

culmina en un estadio final en el que la célula se rompe en cuerpos rodeados de membrana plasmática denominados cuerpos apoptóticos.

La apoptosis es una característica esencial de la vida de cualquier organismo multicelular. La homeostasis del número de células en distintos tejidos y la regeneración de esos mismos se mantiene por el equilibrio entre el crecimiento y la muerte celular programada. Durante el desarrollo, la apoptosis es necesaria para esculpir nuestro cuerpo, formar los órganos y cincelar los dedos de las manos y de los pies. Tanto el sistema nervioso como el sistema inmunitario generan una sobreproducción de células que luego son eliminadas. La apoptosis es necesaria para purgar el cuerpo de células invadidas por patógenos pero también es necesaria para eliminar células activadas o autorreactivas.

La apoptosis es un fenómeno muy regulado ya que exceso o un defecto de muerte celular puede provocar una patología incluyendo defectos en el desarrollo, enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas o cáncer.

3.1. CARACTERÍSTICAS DE LA APOPTOSIS

Una célula que va a sufrir apoptosis activa una cascada de eventos moleculares que culminan en su ordenada desintegración y emisión de sus restos correctamente envueltos. Muchos de estos cambios son característicos y parecen ser únicos de la apoptosis por lo que pueden ser utilizados para identificar este modo de muerte celular.

Uno de los eventos más tempranos de la apoptosis es la deshidratación celular. La pérdida del agua intracelular conlleva la condensación del citoplasma y cambios en la forma y el tamaño celular. Las células, originalmente redondas, aparecen elongadas y, generalmente, más pequeñas. Otro cambio, quizá el más característico de la apoptosis, es la condensación de la cromatina nuclear que comienza en la periferia del núcleo y a menudo adquiere una forma cóncava que se asemeja a una media luna. El DNA en la cromatina condensada presenta hipercromasia y se marca intensamente con sondas fluorescentes. La envuelta nuclear se desintegra, la laminina sufre degradación proteolítica y, por último, se produce la fragmentación nuclear. Algunos fragmentos

nucleares, que se tiñen uniformemente con sondas de DNA y que parecen gotitas de DNA de diferentes tamaños, están dispersos en el citoplasma.

Los fragmentos nucleares junto con los constituyentes del citoplasma (incluyendo orgánulos intactos), son empaquetados y envueltos por fragmentos de membrana plasmática. Estas estructuras, denominadas cuerpos apoptóticos, son emitidas por las células apoptóticas. Cuando la apoptosis sucede *in vivo*, los cuerpos apoptóticos son fagocitados por las células vecinas como fibroblastos o células epiteliales (y no necesariamente por macrófagos profesionales) sin desencadenar ninguna reacción inflamatoria en el tejido (Kerr JFR, 1972; Compton MM, 1992; Wyllie AH, 1992; Wyllie AH and Arends MJ; 1992; Magno G, 1995).

La activación de endonucleasas que cortan preferencialmente el DNA en secciones internucleosomales es otra característica específica de la apoptosis (Arends MJ, 1990; Compton MM, 1992; Wyllie AH and Arends MJ, 1992). Los productos de la degradación del DNA son fragmentos nucleosomales u oligonucleosomales que generan el característico patrón en escalera en electroforesis de geles de agarosa. Como el DNA de las células apoptóticas está parcialmente degradado, la fracción de bajo peso molecular puede ser extraída fácilmente de ellos (Arends MJ, 1992; Compton MM, 1992; Gong J, 1994).

Otra característica específica de la apoptosis es la preservación, al menos en la fase inicial, de la integridad estructural y de la mayoría de las funciones de la membrana plasmática. También, los orgánulos celulares incluyendo la mitocondria y los lisosomas, permanecen preservados durante la apoptosis, aunque el potencial transmembrana de la mitocondria disminuye rápidamente (Lizard G, 1995; Castedo M, 1996; Hedley DW, 1996; Darzynkiewicz Z and Traganos F, 1998). Otras características de la apoptosis son la movilización del catión calcio (Ca^{2+}) intracelular (McConkey DJ, 1996), la activación de la transglutaminasa que une proteínas citoplásmicas (Piacentini M, 1995), la pérdida de microtúbulos (Endersen PC, 1995), pérdida de la asimetría de los fosfolípidos de la membrana plasmática que permite la exposición de la fosfatidilserina en la cara externa

de la membrana plasmática (Fadok VA y Voelker DR, 1992), y otros cambios de la membrana plasmática que preconditionan a los restos de las células apoptóticas a ser objetivos de las células fagocíticas.

La duración de la apoptosis puede variar, pero generalmente es corta (3-6 horas), incluso es más breve que la duración de la mitosis (Kerr JFR, 1972; Wyllie AH, 1992). De esta forma, bajo condiciones de homeostasis, cuando la proporción de células muertas está equilibrada por la tasa de proliferación celular, el índice mitótico puede exceder del índice apoptótico.

3.2. VÍAS DE INDUCCIÓN DE APOPTOSIS

Existen dos tipos generales de vías de señalización que permiten el inicio de la activación de caspasas iniciadoras de la muerte celular programada. La primera de ellas depende de la participación de la mitocondria y la segunda implica a los receptores de muerte como son el receptor 1 de TNF (TNFR-1) y Fas (CD95).

3.2.1. VÍA INTRÍNSECA O MITOCONDRIAL

La mitocondria posee una gran cantidad de proteínas con actividad proapoptótica. La más destacada es el citocromo c, cuya función es el transporte de electrones. Varios trabajos han revelado que el citocromo c, además de su implicación en la fosforilación oxidativa mitocondrial, es uno de los componentes requeridos para la activación de la caspasa-9 en el citosol (Li P, 1997).

La familia de proteínas Bcl-2 está implicada en la regulación del proceso de liberación del citocromo c. Esta familia consta de 19 miembros con al menos uno de los cuatro motivos conservados denominados motivos de homología con Bcl-2. Se clasifican en tres grupos, los miembros del grupo I tienen actividad antiapoptótica mientras que los miembros del grupo II y III tienen actividad proapoptótica.

La vía mitocondrial se ejecuta en respuesta a agresiones externas y a daño en el DNA. Las distintas vías de respuesta convergen en la mitocondria, a menudo a través de la activación de miembros proapoptóticos de la familia de Bcl-2. Los miembros pro y antiapoptóticos de la familia de Bcl-2 se encuentran en la superficie de la mitocondria donde regulan la salida del citocromo c por un mecanismo todavía debatido. Si los miembros proapoptóticos predominan, el citocromo c se libera y se asocia con Apaf-1 y la procaspasa-9 para formar el apoptosoma. El apoptosoma hidroliza la procaspasa-3 a caspasa-3 que se encarga de ejecutar la apoptosis generando distintos subprogramas que culminan en el desmantelamiento ordenado y en la muerte de la célula.

3.2.2. VÍA EXTRÍNSECA O DE LOS RECEPTORES DE MUERTE

Los receptores de muerte de la familia del receptor de TNF (TNFR) incluyen TNFR1, Fas (CD95), DR3/WSL y los receptores del ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)/Apo-2L (TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5). Los miembros de esta familia están caracterizados por presentar de dos a cinco copias de un dominio extracelular rico en cisteína. Los receptores de muerte también poseen un dominio intracelular en el extremo C-terminal del receptor, denominado dominio de muerte. Cuando un ligando se une a estos receptores se puede producir la muerte por apoptosis de la célula que los posee.

El miembro de los receptores de muerte más estudiado y relevante en inmunología es el CD95 o Fas. La oligomerización, más probablemente la trimerización, del CD95 tras la unión de su ligando, FasL (CD95L), es requerida para la transducción de la señal apoptótica. Un complejo de proteínas se asocia con el CD95 activado. Este complejo de señalización inductor de muerte (death-inducing signalling complex, DISC) se forma en el segundo de los receptores trimerizados. Primero, el adaptador FADD (Fas-associated death domain) o Mort1 se une a través de su dominio de muerte al dominio de muerte del CD95. FADD también presenta el denominado dominio efector de muerte (death-effector domain, DED), y, de nuevo por interacciones homólogas, recluta en el DISC la procaspasa-8 (o FLICE) que contiene un DED. Después, la procaspasa-8 es activada

proteolíticamente y la caspasa-8 activa es liberada del DISC al citoplasma formando un heterotetrámero de dos subunidades pequeñas y dos grandes (Muzio M, 1996). La caspasa-8 activa rompe varias proteínas de la célula incluyendo la procaspasa-3, que resulta en su activación y en la finalización de la muerte celular.

La vía de los receptores de muerte y la vía mitocondrial convergen a nivel de la activación de la caspasa-3. El solapamiento y la integración de las dos vías se deben a Bid, un miembro proapoptótico de la familia de Bcl-2. La caspasa-8 media la ruptura de Bid, incrementando enormemente su actividad proapoptótica, lo que resulta en su translocación a la mitocondria donde promueve la liberación del citocromo c. Hay que tener en cuenta que en la mayoría de las condiciones, este solapamiento es mínimo, y las dos vías operan de manera independiente (Gross A, 1999; Yin XM, 1999).

Justificación, Hipótesis y objetivos

La esclerosis múltiple es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta al sistema nervioso central cuya lesión característica consiste en el desarrollo de áreas de desmielinización asociadas a un infiltrado inflamatorio perivascular (Noseworthy JH, 2000). Aunque su etiología se desconoce, está ampliamente aceptada la participación patogénica del sistema inmunitario en el proceso de desmielinización (Pettinelli CB, 1981; Genain CP, 1999). En el desarrollo de esta respuesta lesiva inflamatoria participan de forma relevante linfocitos T (Ando DG, 1989; Huseby ES, 2001) y B (Antel J, 1999; Archelos JJ, 2000; Cross AH, 2001).

La apoptosis es un modo de muerte celular activa y fisiológica codificada genéticamente y con potenciales implicaciones patológicas. Este modo de muerte constituye un mecanismo relevante en diversos procesos fisiológicos del sistema inmunitario como los implicados en el desarrollo de la tolerancia linfocitaria a lo propio y en el control de la expansión clonal tras estimulación antigénica. Alteraciones en la apoptosis de los linfocitos se han implicado en la patogenia de diferentes procesos patológicos, tanto de naturaleza inflamatoria como neoplásica. Así, el desarrollo de su inadecuada regulación en los linfocitos se ha implicado en la presencia y expansión de células T y B autorreactivas. En la EAE, modelo animal de la EM, se ha observado un aumento de la apoptosis de linfocitos T en el SNC de la rata en la fase aguda, que alcanza el máximo en la recuperación, constituyendo un mecanismo de eliminación de las células T encefalitogénicas. Se considera, por tanto, que la apoptosis linfocitaria puede contribuir a la recuperación espontánea de la EAE, así como al desarrollo de tolerancia (Bauer J, 1995).

Se ha propuesto que en la EM existiría una deficiencia, genéticamente determinada, de la apoptosis linfocitaria inducida por su activación en el SNC (Pender, 1998). Esta hipótesis se ha afianzado por estudios necrópsicos de pacientes con EM donde se ha observado un aumento en la expresión de Bcl-2 en las células T de las lesiones desmielinizantes (Zettl UK, 1998) y en estudios *in vitro* donde se ha observado un aumento en la expresión de proteínas con actividad antiapoptótica en los linfocitos de pacientes con EM (Sharief MK, 2002).

El IFN β es una citoquina que ha demostrado ser un tratamiento inmunomodulador eficaz en la EM (Goddin DS, 2002; Jacobs LD, 2000; Comi G, 2001). Su mecanismo de acción no es del todo conocido aunque podría actuar a diferentes niveles incluyendo la inmunomodulación en la reducción de la activación de células T, la inducción de un cambio en su patrón de secreción de citoquinas a favor de un efecto anti-inflamatorio y la prevención de su adhesión y extravasación a través de la barrera hematoencefálica (Teleshova N, 2000; Vallittu AM, 2007; Wang X, 2000; Graber JJ, 2005; Airas L, 2007). Son escasos los estudios que evalúan el papel del IFN β en la regulación de apoptosis linfocitaria, y sus resultados son contradictorios. En un estudio *in vitro* de IFN β sobre linfocitos activados procedentes de pacientes con EM sin tratamiento específico, se observó un aumento en la apoptosis de células T tras su exposición al IFN β (Kaser A, 1999). Sin embargo, en otra investigación *in vitro* similar en células antígeno específicas de individuos sanos y pacientes con EM, no hallaron indicios de que el IFN β indujera un aumento de la actividad de las caspasas o fragmentación del ADN, aunque sí encontraron un incremento de CD95 en la superficie celular (Zipp F, 2000). El IFN β estimula la expresión de CTLA-4 y Fas, proteínas que conducen a la apoptosis de linfocitos, en células T CD4, lo que se ha asociado con una disminución de la activación de linfocitos T autorreactivos (Hallal-Longo DE, 2007). Se han descrito además, aumentos en la expresión de proteínas antiapoptóticas que disminuyen tras el tratamiento con IFN β (Sharief MK, 2002), sin embargo, no se han publicado estudios que determinen la incidencia de la apoptosis espontánea en los linfocitos circulantes.

De acuerdo con estos fundamentos experimentales nuestra hipótesis plantea que existe una alteración en los niveles de apoptosis de los linfocitos circulantes en los pacientes con EM. Teniendo en cuenta la relevancia patogénica de los linfocitos T en esta enfermedad, proponemos que esta variación en la regulación de la apoptosis puede relacionarse con la evolución de la enfermedad. Además, el efecto de fármacos moduladores con actividad sobre la biología de la EM, como el IFN β , puede inducir modificaciones en la entrada en esta forma de muerte celular en las poblaciones de linfocitos circulantes.

Conforme a lo expuesto, en este trabajo nos planteamos establecer la existencia de alteraciones en la apoptosis linfocitaria en pacientes con EM, sus implicaciones clínicas y su uso como marcador terapéutico. Nos propusimos investigar, en pacientes con EMRR y EMSP así como en controles sanos, los siguientes objetivos específicos en células mononucleares circulantes:

- 1- Definir la distribución de las poblaciones de linfocitos en sangre periférica.
- 2- Cuantificar la apoptosis espontánea e inducida y analizar sus vías de activación en linfocitos.
- 3- Evaluar las variaciones en la incidencia de apoptosis en los linfocitos de sangre periférica después de 1, 6 y 12 meses de tratamiento con IFN β , así como durante los posibles brotes que se produzcan durante el tratamiento.

Pacientes y Métodos

1. PACIENTES DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE Y CONTROLES SANOS

El estudio de los pacientes fue designado como abierto, observacional, multicéntrico y ciego. Los sujetos de estudio son pacientes de esclerosis múltiple recidivante-remitente (EMRR) y secundaria progresiva (EMSP). Los pacientes fueron inscritos en 10 hospitales por neurólogos certificados expertos en esclerosis múltiple (EM). El estudio fue aprobado institucionalmente y todos los pacientes dieron su consentimiento para participar.

Un total de 48 pacientes cumplieron los criterios de inclusión de: a) EM clínica de acuerdo con los criterios de Poser (Poser CM, 1983) b) rango de escala expandida del estado de discapacidad (Expanded Disability Status Scale, EDSS) menor de 5,5 c) enfermedad clínicamente activa (definida en pacientes de EMRR por al menos dos brotes en los dos años previos) y d) un periodo de 30 días tras al último brote sin tratamiento. Los criterios de exclusión incluyeron el padecimiento de algún desorden médico sistémico y el uso de algún tipo de inmunomodulador o fármaco inmunosupresor antes del estudio incluyendo esteroides en los 3 meses previos al estudio.

Los pacientes fueron tratados con interferón beta-1b (IFN β) durante 12 meses de acuerdo con el régimen estándar de 250 microgramos subcutáneos cada dos días. Se planearon cuatro visitas: una basal, al mes, los seis meses y doce meses. La visita inicial incluyó información clínica: edad, género, edad de comienzo de la enfermedad, fechas de los brotes en los dos años previos, EDSS y datos de laboratorio. El resto de las visitas incluyeron: EDSS, información de posibles brotes entre visitas y tratamientos concomitantes. Los pacientes que sufrieron brotes entre visitas fueron tratados con dosis altas de esteroides de forma intravenosa por un máximo de cinco días, en estos casos, se realizó un análisis inmunológico adicional antes de la administración de los esteroides. Las muestras de sangre fueron extraídas en los hospitales (no ciego) y enviadas (ciego) para el análisis al laboratorio central (Departamento de Medicina, Universidad de Alcalá). Se refrigeraron 30ml de sangre heparinizada a 4°C y se enviaron al laboratorio central. Las muestras se procesaron siempre el día de la extracción de la sangre. Como referencia para las determinaciones, se incluyeron doce muestras de sangre de controles sanos pareados en edad y sexo.

2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Las células mononucleares de sangre periférica, tanto de los enfermos diagnosticados de EM como de los controles, fueron obtenidas a partir de sangre venosa extraída por punción venosa antecubital en tubos de heparina-litio. La sangre se diluyó en una proporción 1/1 (vol/vol) con suero salino fisiológico. Todo ello se realizó en condiciones estériles.

3. OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA

Para el aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) se procedió a su separación del resto de los componentes de la sangre por gradiente de densidad sobre Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Nyegaard and Co., Norway) (Böyum AJ, 1968). Este método se basa en las diferencias de densidad de las células sanguíneas. En un tubo de centrífuga de 50 ml, se depositan cuidadosamente bajo la sangre diluida y heparinizada 15 ml de Ficoll-Hypaque de densidad 1.077 g/ml. Después de centrifugar durante 45 minutos a 400g, se obtienen tres fases (eritrocitos, ficoll y plasma) separadas por dos interfases; la situada entre el plasma diluido y el ficoll contiene los PBMCs que se recogen aspirando con una pipeta.

Las células así obtenidas se resuspenden en suero salino fisiológico y se centrifugan a 300g durante 10 minutos, se desecha el sobrenadante (proceso de lavado) y el pellet celular se resuspende en suero salino fisiológico. Esta operación se repite dos veces con el objeto de eliminar los compuestos solubles del suero y el Ficoll. Tras el segundo lavado las células se resuspenden en medio RPMI 1640 (Whitaker Bioproducts, Verviers, Bélgica) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY, USA), HEPES 25mM (Biochrom KG, Berlín, Alemania) y 1% de penicilina-estreptomicina (Whitaker Bioproducts). Al RPMI 1640 suplementado se le denominará medio completo. Todo ello se realizó en condiciones estériles.

4. RECuento Y ESTUDIO DE VIABILIDAD CELULAR

En todas las suspensiones celulares se determinó la concentración celular y la viabilidad mediante la dilución con Azul Tripán al 0.1% (Sigma) y recuento con microscopio en cámara de Neubauer (Brand, Wertheim, Alemania). El porcentaje de células vivas se estableció por la capacidad de exclusión del colorante. También se realizó un estudio de la viabilidad celular mediante citometría de flujo utilizando la sonda vital 7-aminoactinomicina D (7AAD, 2.5 µg/ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Sólo se prosiguió el experimento en aquellos casos en que la viabilidad celular fue superior al 90%. Después de la determinación de la concentración celular, las células se diluyeron a una concentración de 0.5×10^6 células/ml en medio completo para ser cultivadas a una concentración de 0.250×10^6 células/ml.

5. ESTUDIO DE INMUNOFENOTIPO

Para el marcaje inmunofluorescente los PBMCs frescos se incubaron con una combinación de anticuerpos marcados con los fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (fluorescein isotiocyanate, FITC), ficoeritrina (phycoerythrin, PE) y conjugado de la proteína clorofil peridina (peridinin chlorophyll protein conjugate, PerCP). Los anticuerpos monoclonales se usaron en combinaciones de tres colores (Tabla 1). En cada experimento se realizaron controles de células sin marcar y células incubadas con anticuerpos monoclonales irrelevantes del mismo isotipo conjugados con FITC, PE y PerCP.

Tabla 1. *Combinaciones de anticuerpos monoclonales utilizadas para el estudio de inmunofenotipo.*

	<i>Fluorocromos</i>		
	FITC	PE	PerCP
Antígeno que reconoce el anticuerpo monoclonal	CD3	CD8	CD4
	CD19	-	CD3
	CD45RA	CD45RO	CD4
	CD45RA	CD45RO	CD8
	CD95	CD8	CD3

Los anticuerpos monoclonales anti-CD3-FITC, anti-CD4-PerCP, anti-CD8-PerCP, anti-CD19-FITC, anti-CD3-PerCP y anti-CD95-FITC se obtuvieron de Becton & Dickinson (Mountain View, CA, USA). Los anticuerpos monoclonales anti-CD8-PE, anti-CD45RA-FITC y anti-CD45RO-PE se obtuvieron de Caltag (San Francisco, CA). La adquisición y el análisis de los datos en tres colores se realizaron en un citómetro FACSCalibur (Becton & Dickinson) utilizando el software CellQuestPro (Becton & Dickinson). Para seleccionar los linfocitos por sus propiedades físicas (FSC-SSC), se realizó una región biparamétrica alrededor de la población CD45⁺CD14⁻.

6. CULTIVOS CELULARES PARA LA MEDIDA DE APOPTOSIS

Los PBMCs se cultivaron en medio completo que consiste en RPMI 1640 (Whitaker Bioproducts, Verviers, Bélgica) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 25nM HEPES (Biochrom KG) y 1% penicilina-estreptomicina (Whitaker Bioproducts, Verviers, Bélgica). Se realizaron cultivos por duplicado en placas de 96

pocillos (Sero-Wel, Viví Sterilin Ltd, Stone, Staffs, UK) de fondo en “U” a una concentración de 0.250×10^6 células/ml (200 μ l) durante 24 horas. En algunos experimentos de detección de caspasas activas el periodo de cultivo fue de 3 horas. La apoptosis espontánea se estudió por cultivo en medio completo en ausencia de compuestos inductores de apoptosis. La apoptosis inducida se estudió en presencia de fitohemaglutinina (PHA, 2 μ g/mL, 182 Difco Lab, Detroit, MI, USA). Todos los cultivos celulares se realizaron en condiciones de esterilidad en una cámara de flujo laminar vertical, empleando materiales estériles de un único uso o bien de varios usos esterilizados en autoclave o con óxido de etileno. Los cultivos se conservaron en una estufa que mantenía una temperatura de 37°C, en atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

7. DETERMINACIÓN DE CÉLULAS APOPTÓTICAS MEDIANTE ANEXINA-V

Durante los estadíos iniciales de la apoptosis, la fosfatidilserina (phosphatidylserine, PS) trasloca desde la cara interna de la membrana plasmática, donde se encuentra en células viables, a la cara externa, donde queda expuesta. Esta traslocación es universal y específica de la apoptosis. La PS traslocada en la cara externa de la membrana puede ser detectada específicamente por la unión de anexina V conjugada con un fluorocromo.

Las células, frescas o cultivadas, se incubaron con una combinación de anticuerpos monoclonales marcados con PE, PerCP y aloficocianina (allophycocyanin, APC) (Tabla 2) durante 20 minutos y a 4°C. En cada experimento se realizaron controles de células sin marcar y células incubadas con anticuerpos monoclonales irrelevantes del mismo isotipo conjugados con PE, PerCP o APC.

Tabla 2. *Combinaciones de anticuerpos monoclonales para la detección de apoptosis mediante anexina V*

	<i>Fluorocromos</i>		
	PE	PerCP	APC
Antígeno que reconoce el anticuerpo	CD45RA	CD4	CD45RO
	CD45RA	CD8	CD45RO
	-	CD8	CD3
	CD5	-	CD19

Después de la incubación con el anticuerpo monoclonal, las células se centrifugaron una sola vez durante 5 minutos a 300g y a 4°C. Las células se resuspendieron en 100µl de un tampón rico en calcio (Hepes 10mM, NaCl 150mM, MgCl 1mM, CaCl 1.8mM, and KCl 5mM (Sigma)) a un pH = 7.4 pues la unión de la anexina V a la PS es dependiente de calcio. Posteriormente, las células se marcaron con una solución de anexina V-FITC (Bender MedSystem) diluida 1/5 en el tampón rico en calcio durante 10 minutos. Finalmente, se adicionaron 100µl de una dilución 1/100 (v/v) de micropartículas CALIBRITE de 6µm (Becton & Dickinson) diluidas en tampón rico en calcio con un 0.05% (w/v) de gelatina (Sigma). La adquisición y el análisis de los datos en cuatro colores se realizaron en un citómetro FACSCalibur (Becton & Dickinson) utilizando el software CellQuest (Becton & Dickinson). Para seleccionar los linfocitos por sus propiedades físicas (FSC-SSC), se realizó una región biparamétrica alrededor de la población CD45⁺CD14⁻.

8. DETERMINACIÓN DE CÉLULAS APOPTÓTICAS MEDIANTE EXTRACCIÓN DE ADN DE BAJO PESO MOLECULAR

Durante la apoptosis se activan específicamente caspasas que hidrolizan y activan endonucleasas. Estas endonucleasas degradan el DNA en fragmentos oligonucleosomales que son múltiplo de aproximadamente 200 pares de bases que es la distancia internucleosomal. Esto genera fragmentos de pequeño tamaño de ADN que pueden ser

extraídos de las células apoptóticas mediante una solución de extracción que contiene buffer citrato y detergente. Debido a esta extracción de parte del ADN en las células apoptóticas, éstas presentan un menor contenido de ADN (hipodiploide) en comparación con el contenido de las células viables (diploide).

Este método está basado en el método de Nicoletti I *et al* (Nicoletti I, 1991) con modificaciones (Prieto A, 2000) que permiten la enumeración de células apoptóticas. Las células se tratan con una solución de buffer citrato que contiene un 0.1% de Tritón X-100 (Sigma) para extraer el ADN de bajo peso molecular del núcleo de las células apoptóticas. El contenido en ADN de las células se marcó con yoduro de propidio (propidium iodide, PI). Inmediatamente antes de la adquisición, se añadieron 100µl de una dilución 1/100 (v/v) de micropartículas CALIBRITE de 6µm diluidas en tampón rico en calcio con un 0.05% (w/v) de gelatina. Las células con un contenido en ADN hipodiploide (células apoptóticas) se distinguen de las células con un contenido diploide de ADN (células viables) midiendo la intensidad de fluorescencia asociada al PI en un citómetro de flujo.

9. DETERMINACIÓN DE FORMAS ACTIVAS DE CASPASAS

Las formas activas de las caspasas 3, 8 y 9 fueron detectadas mediante el uso de inhibidores de caspasas marcados con fluorocromo (fluorochrome-labeled inhibitors of caspases, FLICA) que se unen covalentemente a las formas activas de las caspasas (Smolewski P, 2001; Pozarowski P, 2003). Cada FLICA contiene tres dominios distintos funcionalmente: a) el dominio fluorocromo (carboxifluoresceína o fluoresceína, FAM), b) el dominio de reconocimiento de la caspasa que comprende un péptido de tres o cuatro aminoácidos y c) el motivo de unión covalente que consiste en cloro- ó fluoro-metil cetona (FMK) que se une a la cisteína de la respectiva caspasa formando tiometil cetona que inactiva irreversiblemente a la enzima (Ekert PG, 1999). FLICA penetra a través de la membrana plasmática de las células viables sin resultar tóxico para la célula.

Los kits de detección de caspasa 3 (FAM-DEVD-FMK), caspasa 8 (FAM-LETD-FMK) y caspasa 9 (FAM-LEHD-FMK) se obtuvieron de Immunochemistry Technologies, LLC

(Bloomington, MN, USA). Los FLICA se diluyeron en dimetil sulfóxido para obtener alícuotas 150X que fueron almacenadas a -20°C en oscuridad.

Antes de cada uso, las alícuotas 150X fueron diluidas en proporción 1:5 en PBS para obtener una concentración 30X. Después del periodo de cultivo se añadió FLICA 30X en un ratio de volumen 1:30 y se incubaron las células durante 1 hora a una temperatura de 37°C y en atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. Tras la incubación, las células se marcaron con anticuerpos anti-CD3, se lavaron y se adquirieron en un citómetro FACSCalibur.

10. ENSAYOS DE BLOQUEO DE LA RUTA DE MUERTE DEPENDIENTE DE Fas

En algunos experimentos se bloqueó la función del antígeno CD95 (Fas) para evitar la inducción de apoptosis por Fas en los cultivos celulares. En estos experimentos, se añadió al cultivo 1 µg/mL de un anticuerpo monoclonal anti-CD95 bloqueante (Bender Medsystems, clon SM1/23). Como control negativo se cultivaron las células con 1 µg/mL de un anticuerpo IgG2b irrelevante. Se realizó además un control positivo de inducción de muerte por Fas cultivando las células con 1 µg/mL de un anticuerpo monoclonal anti-CD95 inductor de apoptosis (Bender Medsystems, clon SM1/1).

11. CÁLCULO DEL NÚMERO ABSOLUTO DE CÉLULAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

La enumeración de células por citometría de flujo se basa en la adición de un número conocido de micropartículas de referencia a la muestra problema. Las células y las micropartículas son coadquiridas y la concentración celular se determina calculando el cociente células/partículas aplicando la siguiente fórmula:

$$C_t = (\text{Ratio}_t / \text{Ratio}_0) \times C_0$$

Siendo:

$$\text{Ratio}_t = N_t/\text{RefB}_t$$

$$\text{Ratio}_0 = N_0/\text{RefB}_0$$

Donde:

C_t = concentración de la población de interés a tiempo t (células/ml)

N_t = eventos observados de la población celular de interés a tiempo t

RefB_t = eventos observados de las micropartículas de referencia a tiempo t

N_0 = eventos observados inicialmente de la población celular de interés

RefB_0 = eventos observados inicialmente de las micropartículas de referencia

C_0 = concentración inicial de la población de interés (células/ml)

El citómetro FACSCalibur permite ajustar la parada de la coadquisición de las células y de las micropartículas cuando un número preajustado de micropartículas ha sido adquirido. Una vez que el número de micropartículas a adquirir es fijo (por ejemplo, 2000 micropartículas), este parámetro desaparece de la ecuación al ser constante tanto en la determinación a tiempo 0 (inicialmente) como en la realizada a tiempo t ($\text{RefB}_0 = \text{RefB}_t = \text{cte}$). De este modo, la ecuación se puede simplificar:

$$C_t = (N_t/N_0) \times C_0$$

En esta última ecuación, para calcular el número absoluto de células para la población de interés a tiempo t , sólo son necesarios la concentración inicial de células y el número de eventos observados de la población de interés a tiempo 0 y a tiempo t .

12. CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE CÉLULAS APOPTÓTICAS

El porcentaje de células apoptóticas se calculó a tiempo 0 de cultivo y tras 24 horas. En algunos experimentos de determinación de formas activas de caspasas el porcentaje de células apoptóticas se calculó tras 3 horas de cultivo.

En adición al porcentaje de células apoptóticas se calculó la tasa de apoptosis. El porcentaje de células apoptóticas determina la proporción de células apoptóticas que permanecen en cultivo sin sufrir fragmentación y que mantienen niveles detectables de expresión de sus antígenos de linaje, por el contrario, la tasa de apoptosis mide la proporción de células que han sufrido apoptosis respecto al número original de células sembradas (Prieto A, 2002).

El porcentaje de células apoptóticas de una subpoblación se calcula dividiendo el porcentaje de células que están llevando a cabo la apoptosis en el cultivo (anexinaV⁺, PI⁺, forma activa de caspasa⁺) entre el porcentaje total de células en la muestra (células apoptóticas + células viables). Se utilizó la siguiente fórmula para calcular el porcentaje de células apoptóticas:

$$\% \text{ de células apoptóticas} = 100 * A^{+} / (A^{+} + A^{-})$$

donde:

A⁺ = son las células en apoptosis (anexinaV⁺, PI⁺, forma activa de caspasa⁺)

A⁻ = son las células no apoptóticas (anexinaV⁻, PI⁻, forma activa de caspasa⁻)

El cálculo de la tasa de apoptosis consta de dos pasos. Primero, el número de células que han culminado la apoptosis y han sufrido fragmentación celular en cuerpos apoptóticos es calculado de la diferencia entre el número de células sembradas y el de las células que permanecen en cultivo:

$$NFC = NSC - NRC$$

donde:

NFC = número de células fragmentadas

NSC = número de células sembradas (células a tiempo 0)

NRC = número de células que permanecen en cultivo que incluye células apoptóticas y células viables.

La tasa de apoptosis se calcula ahora mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Tasa de apoptosis} = 100 * (\text{NApo} + \text{NFC}) / \text{NSC}$$

donde:

NApo = número de células apoptóticas

Puede realizarse un cálculo más inmediato de la tasa de apoptosis mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Tasa de apoptosis} = 100 * (\text{NSC} - \text{NCV}) / \text{NSC}$$

Donde:

NCV = número de células viables

Para calcular la muerte celular que se puede atribuir a la muerte inducida por activación (AICD, Activation-Induced Cell Death) se empleó la siguiente fórmula:

$$\% \text{AICD} = \% A_{\text{inducida}} - \% A_{\text{espontánea}}$$

Donde:

%AICD= Apoptosis que se atribuye a AICD

%A_{inducida}= Apoptosis tras estimulación con PHA

%A_{espontánea}= Apoptosis espontánea

13. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versión 12.0. Se realizó un análisis descriptivo de variables cualitativas entre las que se incluyen el tamaño, la media, la mediana, la desviación estándar, el coeficiente de variación, el error estándar, el rango intercuartílico y los valores máximos y mínimos.

Las comparaciones entre pacientes de EM en los distintos tiempos de estudio y controles sanos, entre pacientes de EM RR y pacientes de EM SP o entre pacientes de EM que sufrieron más de dos brotes en los dos años anteriores al comienzo del estudio y pacientes de EM que sufrieron dos o menos brotes se realizaron aplicando el test no pareado U de Mann-Whitney. La significación estadística se ajustó a $p < 0,05$.

Las comparaciones entre las diferentes visitas de los pacientes de EM se realizaron aplicando el test pareado de Wilcoxon. La significación estadística se ajustó a $p < 0,05$.

La comparación del número de pacientes con valores de apoptosis por encima del rango de los controles al comienzo del tratamiento y después de un año se realizó aplicando el test de Chi cuadrado.

RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS DE LOS PACIENTES DE EM

Las características demográficas y clínicas de los pacientes de EM antes y durante el tratamiento se muestran en la tabla 1. Dos pacientes se retiraron del estudio, uno de ellos voluntariamente y otro debido a una depresión.

Tabla 1. *Características demográficas y clínicas de los pacientes de EM*

Número total de casos	48	
Casos que completaron el seguimiento	46 (95.8%)	
Edad (media, DE) (años)	37±11	
Sexo (F/M)	31 (64.6%)/17(35.4%)	
Edad al diagnóstico (media, DE)(años)	28±12	
EDSS (media, DE)	3±2	
Brote en los 2 años previos	EMRR (n:27)	EMSP (n:21)
Si	27 (100%)	15 (71.4%)
No	0 (0%)	6 (28.6%)
Brote durante el estudio		
Si	9 (33.3%)	6 (28.6%)
No	18 (66.7%)	15 (71.4%)

2. DISTRIBUCIÓN DE POBLACIONES DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON EM

Se comparó la distribución de poblaciones celulares de sangre periférica de pacientes con EM con la de controles sanos. El porcentaje de células T (CD3+) fue significativamente menor en los pacientes con EM ($p<0.05$) (Figura 1). Además, se observó un descenso significativo en el porcentaje de células T CD8+ ($p<0.05$) y un aumento en el de células T CD4+ ($p<0.05$) respecto al total de células CD3+ (Figura 1). No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de las subpoblaciones T CD4+ y CD8+ definidas por la expresión de las isoformas del CD45 (CD4+CD45RA+, CD4+CD45RO+, CD8+CD45RA+ y CD8+CD45RO+). No se observó ninguna diferencia significativa en los porcentajes de linfocitos B.

No se encontraron diferencias significativas en la distribución de células entre pacientes con EMRR y EMSP.

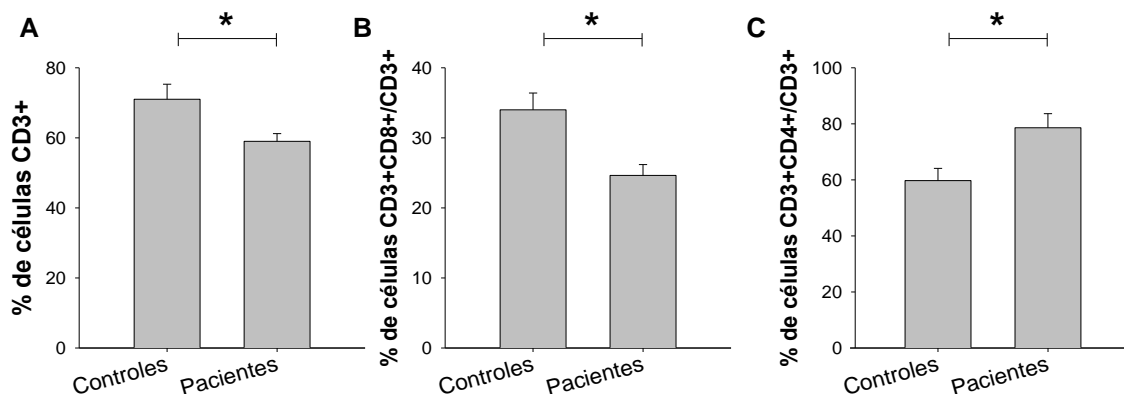


Figura 1. Porcentaje de poblaciones de linfocitos T en pacientes con EM y controles sanos.

Muestra los porcentajes de diferentes poblaciones de células T de 46 pacientes con EM y 12 controles sanos. El porcentaje de células CD3+ con respecto al total de linfocitos se muestra en el panel A, el porcentaje de células CD3+CD8+ con respecto a los linfocitos CD3+ se muestra en el panel B y el porcentaje de células CD3+CD4+ con respecto a los linfocitos CD3+ se muestra en el panel C. Los datos se muestran como media±EEM. (*) Indica diferencias significativas ($p<0.05$) entre pacientes con EM y controles sanos.

3. ESTUDIO DE LA APOPTOSIS EN LINFOCITOS DE PACIENTES CON EM ANTES DEL TRATAMIENTO CON IFN β

Para estudiar la susceptibilidad a la apoptosis de los linfocitos de pacientes de EM se emplearon tres métodos de citometría de flujo diferentes: determinación de células apoptóticas mediante marcaje con anexina-V, identificación de núcleos apoptóticos por contenido hipodiploide de ADN y determinación de formas activas de caspasas. Independientemente del método utilizado se observó un aumento del porcentaje de linfocitos T apoptóticos tras 24 horas de cultivo en los pacientes con EM.

3.1 DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS MEDIANTE ANEXINA-V EN PACIENTES CON EM SIN TRATAR CON IFN β

En la figura 2 se observa un ejemplo de análisis por citometría de flujo de un caso representativo del estudio de apoptosis espontánea tras 24 horas de cultivo determinada mediante marcaje con anexina-V en un paciente con EM y un control sano.

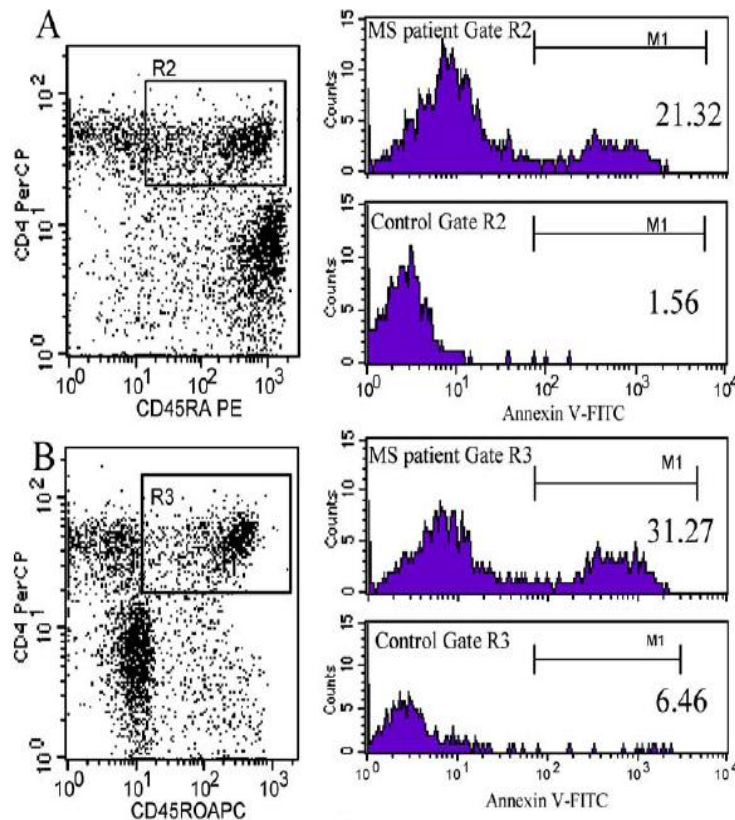


Figura 2. Determinación de apoptosis mediante anexina-V.

La apoptosis espontánea se analizó tras 24 horas de cultivo por el método de unión de anexina-V en las células CD4+CD45RA+ (panel A, región R2) y CD4+CD45RO+ (panel B, región R3). Cada población celular fue seleccionada en un dot-plot biparamétrico (izquierda) y la apoptosis se evaluó por el porcentaje de células anexina-V positivas (derecha). Los dos histogramas de cada panel muestran un paciente de EM representativo (histograma superior) y un control (histograma inferior).

3.1.1. PROPORCIÓN DE CÉLULAS APOPTÓTICAS EN PBMCs FRESCOS

Tras la separación de los PBMCs del resto de componentes de la sangre se determinó la proporción de células apoptóticas antes del cultivo. No se encontraron diferencias significativas entre pacientes con EM y controles sanos en ninguna de las poblaciones estudiadas (Figura 3).

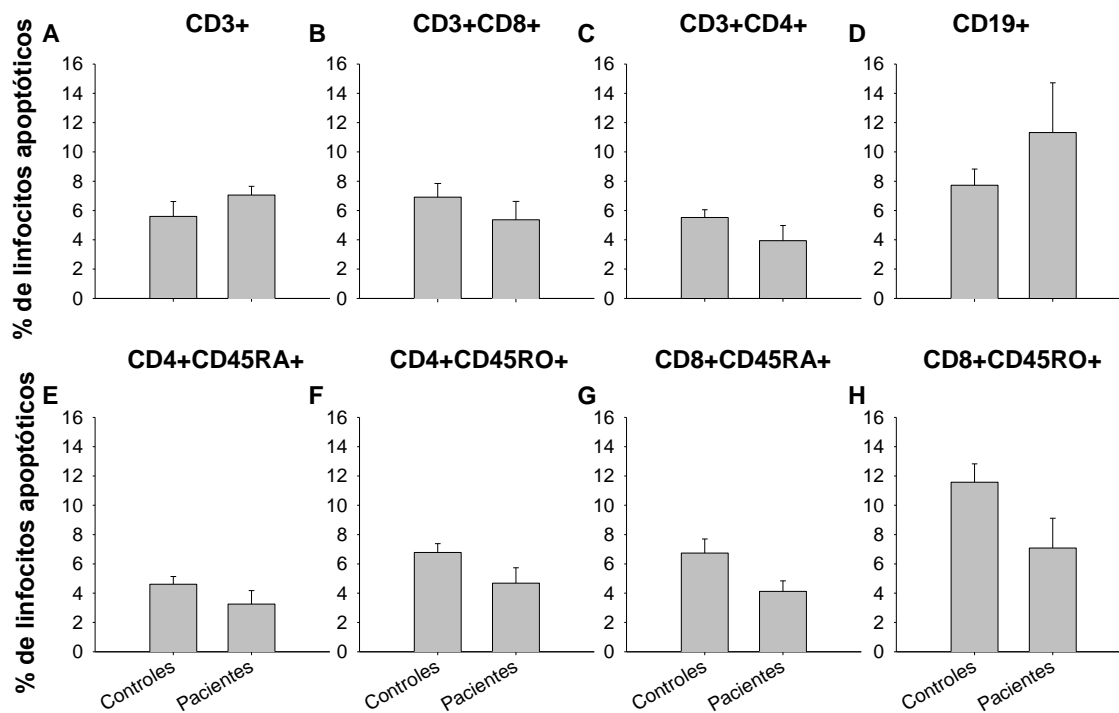


Figura 3. Apoptosis en subpoblaciones de linfocitos de controles sanos y pacientes con EM después de la separación de PBMCs.

La apoptosis de células mononucleares de sangre periférica se determinó inmediatamente después de la separación del resto de componentes de la sangre. La apoptosis se estimó como porcentaje de células apoptóticas fosfatidil serina positivas. Los diferentes paneles muestran la apoptosis de 12 controles sanos y 46 pacientes con EM. El porcentaje de linfocitos CD3+ apoptóticos se muestra en el panel A, el porcentaje de linfocitos CD3+CD8+ apoptóticos se muestra en el panel B, el porcentaje de linfocitos CD3+CD4+ apoptóticos se muestra en el panel C, el porcentaje de linfocitos CD19+ apoptóticos se muestra en el panel D, el porcentaje de linfocitos CD4+CD45RA+ apoptóticos se muestra en el panel E, el porcentaje de linfocitos CD4+CD45RO+ apoptóticos se muestra en el panel F, el porcentaje de linfocitos CD8+CD45RA+ apoptóticos se muestra en el panel G, el porcentaje de linfocitos CD8+CD45RO+ apoptóticos se muestra en el panel H. Los datos se muestran como media ± EEM. (*) indica diferencias significativas entre pacientes con EM y controles sanos.

3.1.2. PROPORCIÓN DE CÉLULAS APOPTÓTICAS EN CULTIVO

El porcentaje de linfocitos totales en apoptosis tras 24 horas de cultivo sin estimulación fue significativamente mayor en los pacientes con EM respecto a los controles sanos ($p < 0.04$), sin embargo, cuando se analizaron las diferentes poblaciones de linfocitos se observó que este aumento ocurrió selectivamente en los linfocitos T ($p < 0.03$) (Figura 4). Este aumento de apoptosis espontánea de los linfocitos T ocurrió tanto en linfocitos CD3+CD4+ ($p < 0.03$) como en linfocitos CD3+CD8+ ($p < 0.002$). En las poblaciones definidas por las isoformas de CD45 (CD45RA+ y CD45RO+) también se encontró un aumento en la apoptosis espontánea en los pacientes con EM tanto en células T CD4+ ($p < 0.008$ y $p < 0.002$ para CD45RA+ y CD45RO+, respectivamente) como en células T CD8+ ($p < 0.004$ y $p < 0.005$ para CD45RA+ y CD45RO+, respectivamente). Antes del tratamiento con IFN β , más de la mitad de los pacientes con EM (56%) mostraron valores de apoptosis de linfocitos T por encima del límite superior de los controles de referencia (Tabla 2).

Tabla 2. *Pacientes con valores de apoptosis espontánea por encima del rango de controles sanos antes del tratamiento con IFN β*

	Controles Sanos	Pacientes por encima del límite superior
	Rango de células apoptóticas (mínimo %-máximo %)	Basal n=46 Número (%)
CD3+	(3.61-16.28)	26 (56%)
CD3+CD8+	(2.57-12.42)	26 (56%)
CD3+CD4+	(1.71-13.53)	23 (50%)
CD4+CD45RA+	(0.91-7.53)	27 (58%)
CD8+CD45RA+	(1.61-8.24)	30 (65%)
CD4+CD45RO+	(2.90-21.59)	20 (44%)
CD8+CD45RO+	(3.37-16.75)	26 (56%)
CD19+	(10.71-55.49)	2 (4%)
CD19+CD5+	(0.77-13.99)	13 (29%)

Cuando se compararon los pacientes en base a sus características clínicas no se encontraron diferencias en los valores de apoptosis espontánea entre pacientes con EMRR y EMSP. Sin embargo, se observó que aquellos pacientes que sufrieron más de dos brotes en los dos años anteriores al estudio, tenían valores de apoptosis espontánea significativamente mayores que en los pacientes que sufrieron dos o menos brotes (figura 4). Esto se observó en la población total de linfocitos ($p<0.003$) y las subpoblaciones CD3+ ($p<0.003$), CD3+CD4+ ($p<0.005$), CD4+CD45RA+ ($p<0.002$), CD4+CD45RO+ ($p<0.007$), CD3+CD8+ ($p<0.005$), CD8+CD45RA+ ($p<0.001$) y CD8+CD45RO+ ($p<0.003$). No se encontró ninguna diferencia en el porcentaje de apoptosis en células B. Los pacientes con EMSP que no sufrieron brotes en los dos años previos al estudio presentaron valores de apoptosis normales. Se encontraron diferencias significativas entre estos pacientes y los pacientes con EMSP que si sufrieron brotes en los dos años previos

al estudio y los pacientes con EMRR en las subpoblaciones CD3+, CD3+CD4+ , CD4+CD45RA+, CD4+CD45RO+, CD3+CD8+, CD8+CD45RA+ y CD8+CD45RO+ (figura 5). Además, se encontraron correlaciones positivas significativas entre los porcentajes de células apoptóticas y el número de brotes sufridos en los dos años previos al estudio en las poblaciones CD3+CD4+, CD4+CD45RA+, CD4+CD45RO+, CD8+CD45RA+ y CD8+CD45RO+ (tabla 3).

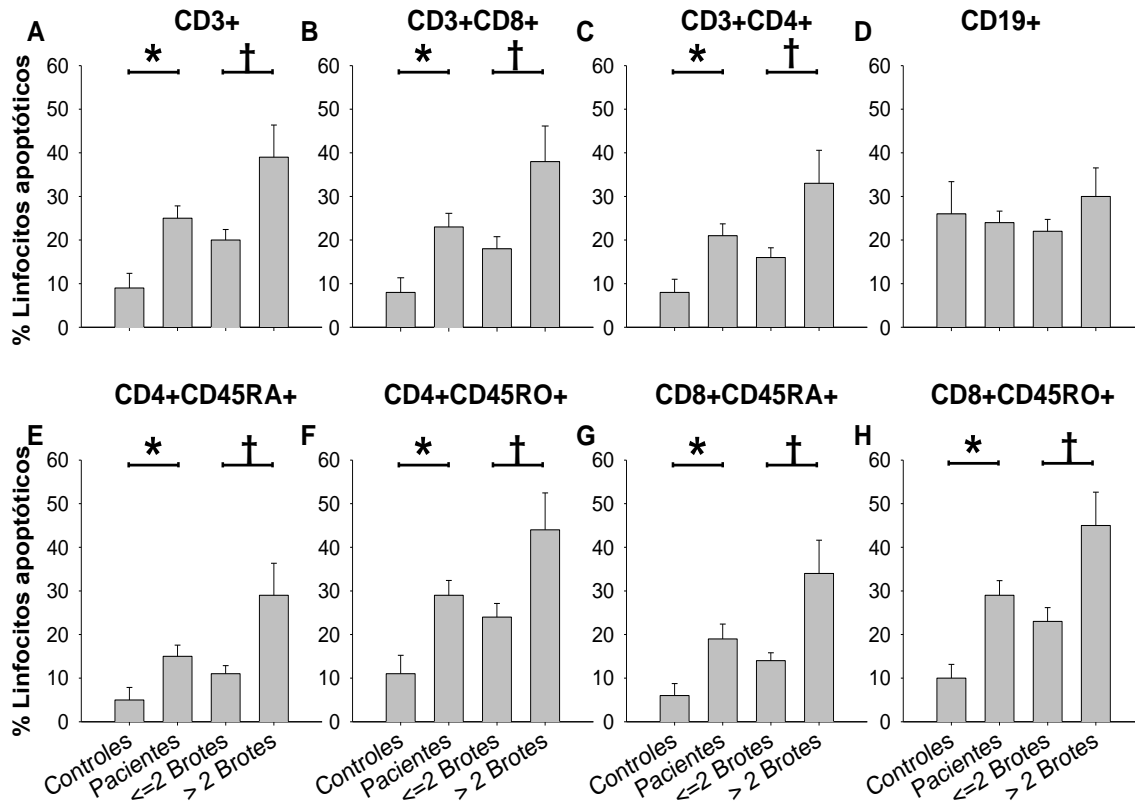


Figura 4. Apoptosis espontánea en subpoblaciones de linfocitos de controles sanos y pacientes con EM y pacientes con EM en función al número de brotes en los dos años previos al estudio.

Las células mononucleares de sangre periférica se cultivaron 24 horas en medio completo. La apoptosis espontánea se estimó como porcentaje de células apoptóticas fosfatidil serina positivas. Los diferentes paneles muestran la apoptosis espontánea de 12 controles sanos, 46 pacientes con EM, 35 pacientes con EM que sufrieron 2 o menos brotes en los dos años anteriores al estudio (≤ 2 brotes) y 11 pacientes con EM que sufrieron más de 2 brotes en el mismo periodo (> 2 brotes). El porcentaje de linfocitos CD3+ apoptóticos se muestra en el panel A, el porcentaje de linfocitos CD3+CD8+ apoptóticos se muestra en el panel B, el porcentaje de linfocitos CD3+CD4+ apoptóticos se muestra en el panel C, el porcentaje de linfocitos CD19+ apoptóticos se muestra en el panel D, el porcentaje de linfocitos CD4+CD45RA+ apoptóticos se muestra en el panel E, el porcentaje de linfocitos CD4+CD45RO+ apoptóticos se muestra en el panel F, el porcentaje de linfocitos CD8+CD45RA+ apoptóticos se muestra en el panel G, el porcentaje de linfocitos CD8+CD45RO+ apoptóticos se muestra en el panel H. Los datos se muestran como media \pm EEM. (*) indica diferencias significativas entre pacientes con EM y controles sanos. (†) indica diferencias significativas entre pacientes con EM con 2 o menos brotes en los dos años previos al estudio y pacientes con más de 2 brotes.

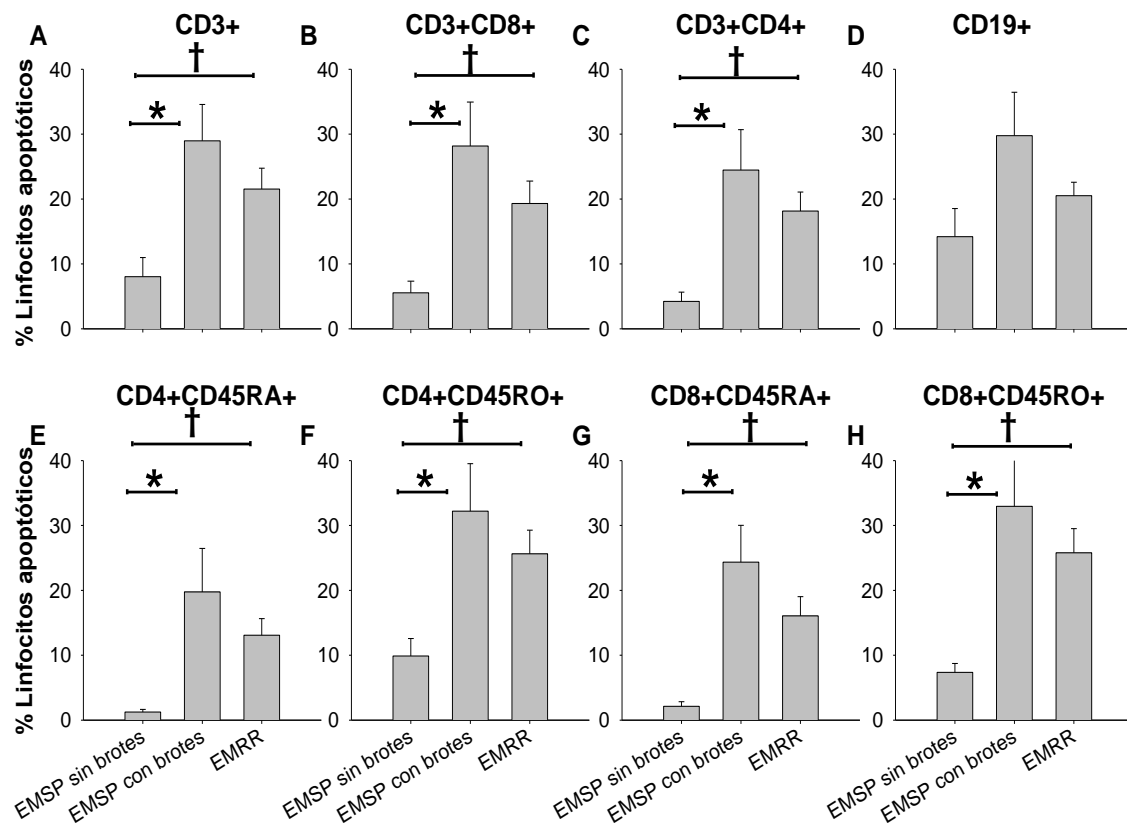


Figura 5. Apoptosis espontánea en subpoblaciones de linfocitos de pacientes con EMSP que no tuvieron brotes en los dos años previos al estudio, pacientes con EMSP que tuvieron brotes en los dos años previos al estudio y pacientes con EMRR.

Las células mononucleares de sangre periférica se cultivaron 24 horas en medio completo. La apoptosis espontánea se estimó como porcentaje de células apoptóticas fosfatidil serina positivas. Los diferentes paneles muestran la apoptosis espontánea de 5 pacientes EMSP que no tuvieron brotes en los dos años previos al estudio, 14 pacientes EMSP que tuvieron brotes en los dos años previos al estudio y 27 pacientes EMRR. El porcentaje de linfocitos CD3+ apoptóticos se muestra en el panel A, el porcentaje de linfocitos CD3+CD8+ apoptóticos se muestra en el panel B, el porcentaje de linfocitos CD3+CD4+ apoptóticos se muestra en el panel C, el porcentaje de linfocitos CD19+ apoptóticos se muestra en el panel D, el porcentaje de linfocitos CD4+CD45RA+ apoptóticos se muestra en el panel E, el porcentaje de linfocitos CD4+CD45RO+ apoptóticos se muestra en el panel F, el porcentaje de linfocitos CD8+CD45RA+ apoptóticos se muestra en el panel G, el porcentaje de linfocitos CD8+CD45RO+ apoptóticos se muestra en el panel H. Los datos se muestran como media±EEM. (*) indica diferencias significativas entre pacientes de EMSP sin brotes y pacientes EMSP con brotes. (†) indica diferencias significativas entre pacientes de EMSP sin brotes y pacientes EMRR.

Tabla 3. *Correlación entre el porcentaje de apoptosis en linfocitos de pacientes con EM tras 24 horas de cultivo y el número de brotes sufridos en los dos años previos al estudio.*

Subpoblación	Apoptosis espontánea		Apoptosis inducida	
	Valor de <i>p</i>	Coefficiente de correlación (<i>r</i>)	Valor de <i>p</i>	Coefficiente de correlación (<i>r</i>)
CD3+CD4+	0.028*	0.33	0.017*	0.37
CD4+CD45RA+	0.005*	0.42	0.003*	0.44
CD4+CD45RO+	0.028*	0.33	0.012*	0.39
CD3+CD8+	0.080	0.26	0.157	0.22
CD8+CD45RA+	0.035*	0.32	0.014*	0.38
CD8+CD45RO+	0.001*	0.47	0.050*	0.31
CD19+	0.300	0.16	0.773	0.05

Los coeficientes de correlación y los valores de *p* se obtuvieron utilizando en test de correlación divariado de Spearman. (*) Indica una correlación positiva entre el porcentaje de células apoptóticas y el número de brotes en los dos años previos al estudio.

Posteriormente, se determinó la muerte celular que se puede atribuir a AICD. Para ello, se estimó primero el porcentaje apoptosis inducida por mitógeno tras 24 horas de cultivo. Cuando se comparó el porcentaje de células apoptóticas de pacientes con EM con controles sanos no se encontraron diferencias en los linfocitos B, sin embargo, al igual que en la apoptosis espontánea, se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de células apoptóticas de las poblaciones CD3+ ($p<0.05$), CD3+CD4+ ($p<0.05$), CD4+CD45RA+ ($p<0.03$), CD4+CD45RO+ ($p<0.006$), CD8+CD45RA+ ($p<0.02$) y CD8+CD45RO+ ($p<0.009$) (figura 6).

No se encontraron diferencias significativas entre pacientes con EMRR y EMSP. Al igual que en la apoptosis espontánea, los pacientes que sufrieron más de dos brotes en los dos años previos al estudio mostraron una apoptosis significativamente mayor que los pacientes que sufrieron dos o menos brotes en las poblaciones CD3+ ($p<0.01$), CD3+CD4+ ($p<0.005$), CD4+CD45RA+ ($p<0.003$), CD4+CD45RO+ ($p<0.009$), CD3+CD8+ ($p<0.007$), CD8+CD45RA+ ($p<0.01$) y CD8+CD45RO+ ($p<0.009$) (figura 6). En la apoptosis inducida por mitógeno también se encontraron correlaciones positivas entre el porcentaje de células apoptóticas y el número de brotes sufridos en los dos años

previos al estudio en las poblaciones CD3+CD4+, CD4+CD45RA+, CD4+CD45RO+, CD8+CD45RA+ y CD8+CD45RO+ (tabla 3).

Una vez determinada la apoptosis inducida por mitógeno, se calculó la muerte por AICD restando a la apoptosis inducida por mitógeno la apoptosis espontánea. No se encontraron diferencias significativas entre pacientes con EM y controles sanos tanto en linfocitos T como en linfocitos B. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre pacientes según sus características clínicas.

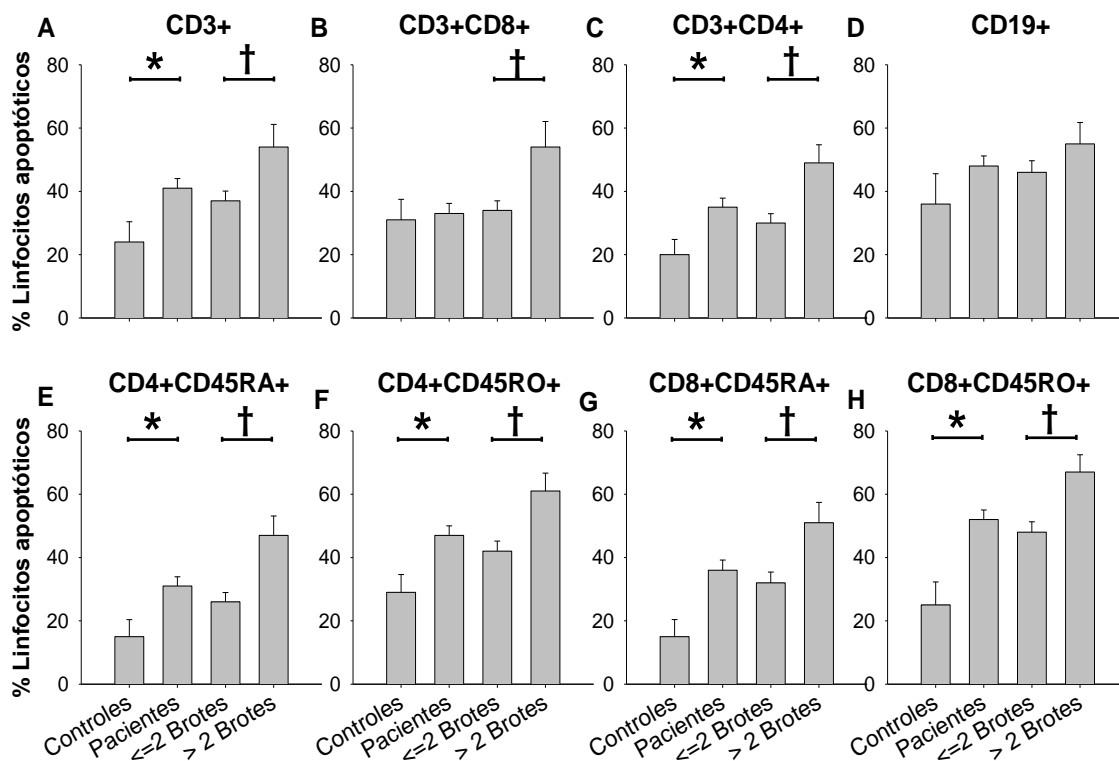


Figura 6. Apoptosis inducida por mitógeno en subpoblaciones de linfocitos de controles sanos y pacientes con EM y pacientes con EM en función al número de brotes en los dos años previos al estudio.

Las células mononucleares de sangre periférica se cultivaron 24 horas en medio completo en presencia de PHA. La apoptosis inducida se estimó como porcentaje de células apoptóticas fosfatidil serina positivas. Los diferentes paneles muestran la apoptosis espontánea de 12 controles sanos, 46 pacientes con EM, 35 pacientes con EM que sufrieron 2 o menos brotes en los dos años anteriores al estudio (≤ 2 brotes) y 11 pacientes con EM que sufrieron más de 2 brotes en el mismo periodo (> 2 brotes). El porcentaje de linfocitos CD3+ apoptóticos se muestra en el panel A, el porcentaje de linfocitos CD3+CD8+ apoptóticos se muestra en el panel B, el porcentaje de linfocitos CD3+CD4+ apoptóticos se muestra en el panel C, el porcentaje de linfocitos CD19+ apoptóticos se muestra en el panel D, el porcentaje de linfocitos CD4+CD45RA+ apoptóticos se muestra en el panel E, el porcentaje de linfocitos CD4+CD45RO+ apoptóticos se muestra en el panel F, el porcentaje de linfocitos CD8+CD45RA+ apoptóticos se muestra en el panel G, el porcentaje de linfocitos CD8+CD45RO+ apoptóticos se muestra en el panel H. Los datos se muestran como media \pm EEM. (*) indica diferencias significativas entre pacientes con EM y controles sanos. (†) indica diferencias significativas entre pacientes con EM con 2 o menos brotes en los dos años previos al estudio y pacientes con más de 2 brotes.

3.1.3. PROPORCIÓN DE CÉLULAS APOPTÓTICAS EN RELACIÓN AL NÚMERO DE CÉLULAS SEMBRADAS

Para complementar el estudio del porcentaje de células apoptóticas que permanecen en el cultivo, se realizó un estudio del porcentaje de células apoptóticas tras cultivo respecto al número inicial de células sembradas (tasa de apoptosis). En la población total de linfocitos se observó un aumento del número absoluto de células que han sufrido apoptosis de pacientes con EM respecto a las de controles sanos ($p < 0.003$). Este aumento ocurrió exclusivamente en los linfocitos T ($p < 0.013$) (figura 7). Dentro de los linfocitos T, el aumento de apoptosis espontánea se observó en las poblaciones CD3+CD4+ ($p < 0.003$), CD3+CD8+ ($p < 0.015$), CD4+CD45RA+ ($p < 0.008$), CD4+CD45RO+ ($p < 0.002$), CD8+CD45RA+ ($p < 0.004$) y CD8+CD45RO+ ($p < 0.005$).

Al igual que en el porcentaje de células apoptóticas que permanecen en cultivo, no se encontraron diferencias de tasa de apoptosis entre pacientes EMRR y EMSP pero si se observó un aumento de tasa de apoptosis en aquellos pacientes que tuvieron más de dos brotes en los dos años previos al estudio. Este aumento ocurrió en las poblaciones CD3+ ($p < 0.005$), CD3+CD4+ (0.001), CD3+CD8+ ($p < 0.02$), CD4+CD45RA+ ($p < 0.005$), CD4+CD45RO+ ($p < 0.004$), CD8+CD45RA+ ($p < 0.05$) y CD8+CD45RO+ ($p < 0.05$) (figura 7).

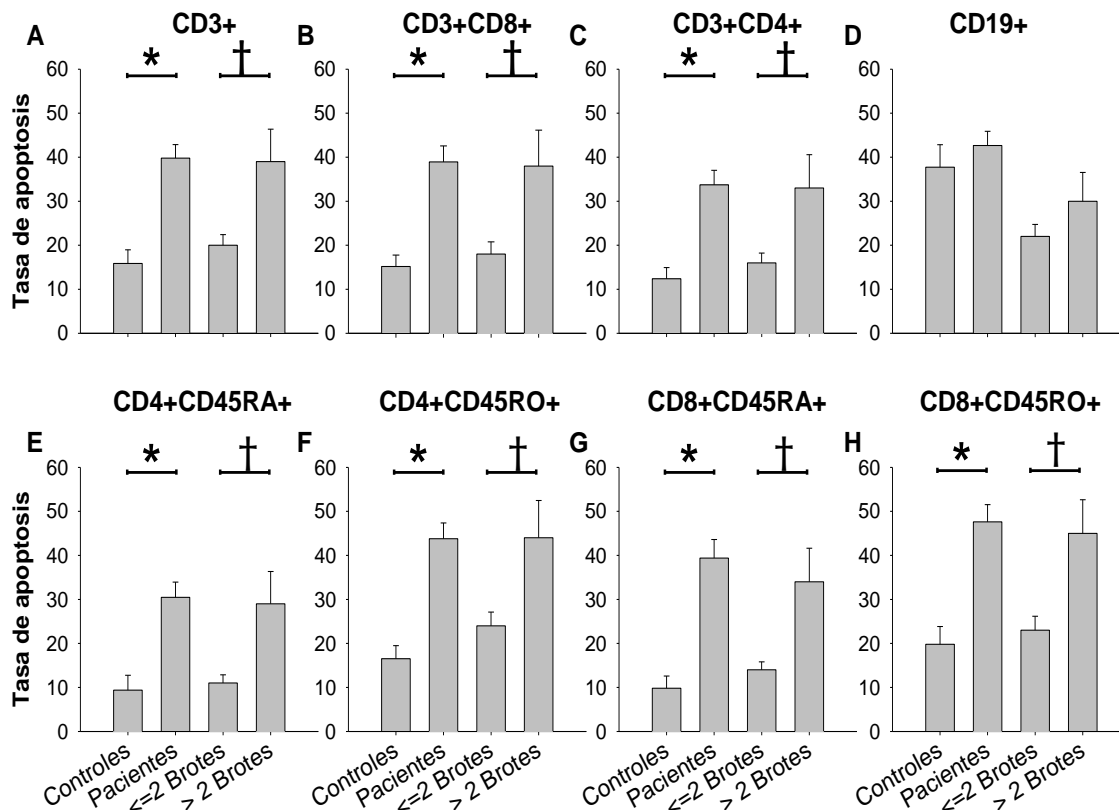


Figura 7. Tasa de apoptosis espontánea en subpoblaciones de linfocitos de controles sanos y pacientes con EM y pacientes con EM en función al número de brotes en los dos años previos al estudio.

Las células mononucleares de sangre periférica se cultivaron 24 horas en medio completo. La apoptosis espontánea se estimó como porcentaje de células apoptóticas fosfatidil serina positivas respecto al número inicial de células sembradas. Los diferentes paneles muestran la apoptosis espontánea de 12 controles sanos, 46 pacientes con EM, 35 pacientes con EM que sufrieron 2 o menos brotes en los dos años anteriores al estudio (≤ 2 brotes) y 11 pacientes con EM que sufrieron más de 2 brotes en el mismo periodo (> 2 brotes). La tasa de apoptosis de linfocitos CD3+ se muestra en el panel A, la tasa de apoptosis de linfocitos CD3+CD8+ se muestra en el panel B, la tasa de apoptosis de linfocitos CD3+CD4+ se muestra en el panel C, la tasa de apoptosis de linfocitos CD19+ se muestra en el panel D, la tasa de apoptosis de linfocitos CD4+CD45RA+ se muestra en el panel E, la tasa de apoptosis de linfocitos CD4+CD45RO+ se muestra en el panel F, la tasa de apoptosis de linfocitos CD8+CD45RA+ se muestra en el panel G, la tasa de apoptosis de linfocitos CD8+CD45RO+ se muestra en el panel H. Los datos se muestran como media \pm EEM. (*) indica diferencias significativas entre pacientes con EM y controles sanos. (†) indica diferencias significativas entre pacientes con EM con 2 o menos brotes en los dos años previos al estudio y pacientes con más de 2 brotes.

En la apoptosis inducida por mitógeno no se encontraron diferencias significativas entre pacientes con EM y controles sanos en ninguna población de linfocitos (figura 8). Tampoco se encontraron diferencias significativas cuando se compararon pacientes EMRR y EMSP ni cuando se compararon los pacientes según el número de brotes en los dos años previos al estudio.

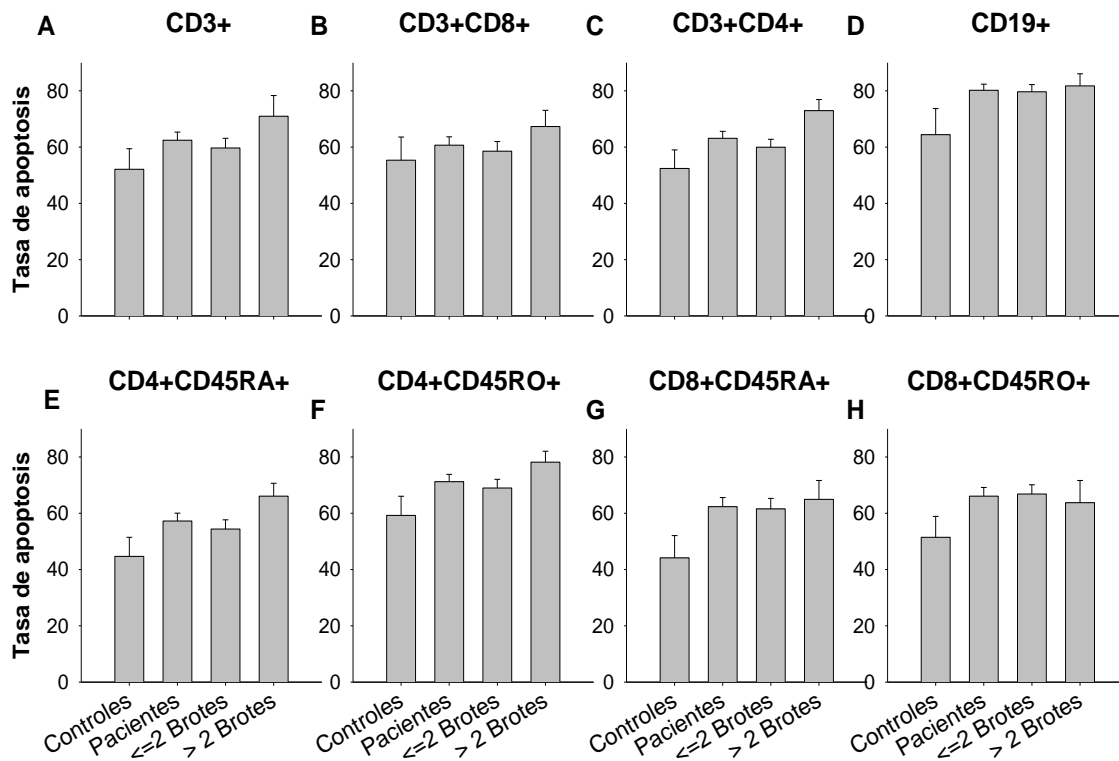


Figura 8. Tasa de apoptosis inducida en subpoblaciones de linfocitos de controles sanos y pacientes con EM y pacientes con EM en función al número de brotes en los dos años previos al estudio.

Las células mononucleares de sangre periférica se cultivaron 24 horas en medio completo en presencia de PHA. La apoptosis inducida se estimó como porcentaje de células apoptóticas fosfatidil serina positivas respecto al número inicial de células sembradas. Los diferentes paneles muestran la apoptosis inducida de 12 controles sanos, 46 pacientes con EM, 35 pacientes con EM que sufrieron 2 o menos brotes en los dos años anteriores al estudio (≤ 2 brotes) y 11 pacientes con EM que sufrieron más de 2 brotes en el mismo periodo (> 2 brotes). La tasa de apoptosis de linfocitos CD3+ se muestra en el panel A, la tasa de apoptosis de linfocitos CD3+CD8+ se muestra en el panel B, la tasa de apoptosis de linfocitos CD3+CD4+ se muestra en el panel C, la tasa de apoptosis de linfocitos CD19+ se muestra en el panel D, la tasa de apoptosis de linfocitos CD4+CD45RA+ se muestra en el panel E, la tasa de apoptosis de linfocitos CD4+CD45RO+ se muestra en el panel F, la tasa de apoptosis de linfocitos CD8+CD45RA+ se muestra en el panel G, la tasa de apoptosis de linfocitos CD8+CD45RO+ se muestra en el panel H. Los datos se muestran como media \pm EEM. (*) indica diferencias significativas entre pacientes con EM y controles sanos. (†) indica diferencias significativas entre pacientes con EM con 2 o menos brotes en los dos años previos al estudio y pacientes con más de 2 brotes.

3.2. DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS MEDIANTE EXTRACCIÓN DE ADN DE BAJO PESO MOLECULAR EN PACIENTES CON EM SIN TRATAR

Como método alternativo a la unión de anexina-V, se utilizó un método basado en la fragmentación de ADN que ocurre en las células apoptóticas. En la figura 9 se observa un ejemplo de análisis por citometría de flujo de un caso representativo de apoptosis espontánea tras 24 horas de cultivo determinada mediante extracción de ADN de bajo peso molecular en pacientes con EM y en controles sanos.

El método de extracción de ADN de bajo peso molecular mostró menor sensibilidad que el método de unión de anexina-V pues se obtuvieron porcentajes menores de células apoptóticas (figuras 10 y 11).

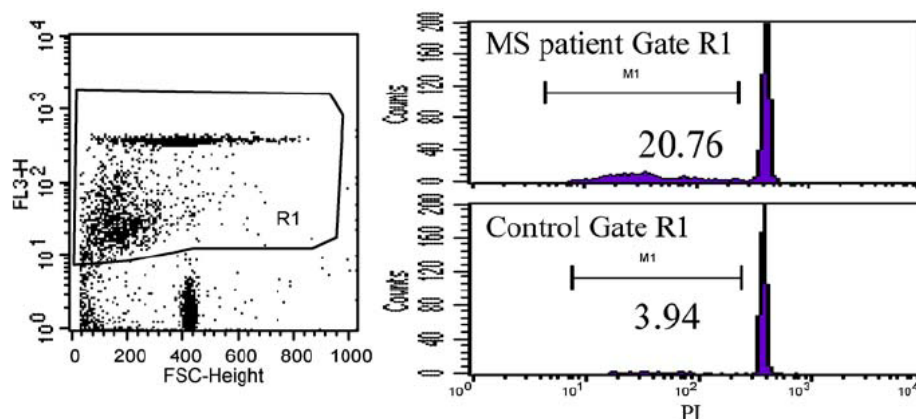


Figura 9. Determinación de apoptosis mediante extracción de ADN de bajo peso molecular.

La apoptosis espontánea se analizó tras 24 horas de cultivo por el método de extracción de ADN de bajo peso molecular. Las células se seleccionaron en un diagrama de puntos FSC/Ioduro de propidio (PI) y la apoptosis se evaluó como porcentaje de células hipodiploides en un histograma de PI de un paciente de EM característico (histograma superior) y de un control sano (histograma inferior).

Los linfocitos de pacientes con EM mostraron una apoptosis espontánea significativamente mayor que los de los controles sanos ($p=0.027$) (figura 10). Los pacientes que sufrieron más de dos brotes en los años previos al estudio mostraron mayor porcentaje de linfocitos apoptóticos que los pacientes que sufrieron menos de dos brotes,

sin embargo, a diferencia del estudio de unión de anexina-V, la diferencia no fue significativa ($p=0.08$) (figura 9). No se obtuvieron diferencias significativas entre pacientes EMRR y EMSP.

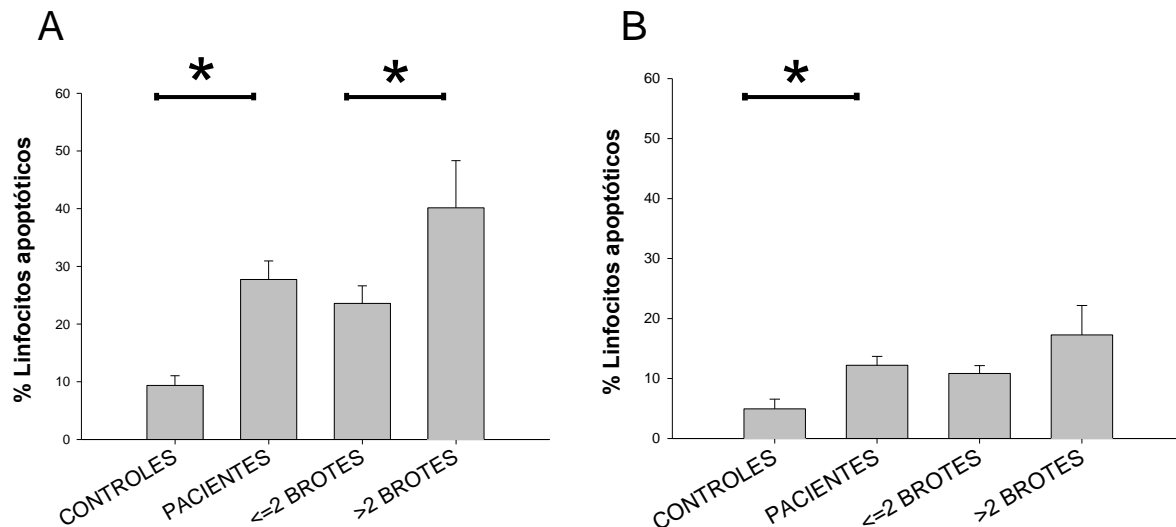


Figura 10. Apoptosis espontánea de PBMCs de pacientes con EM y controles sanos medida por unión de anexina-V y extracción de ADN de bajo peso molecular.

Los PBMCs se cultivaron en medio completo durante 24h. La apoptosis espontánea se determinó por el método de unión de anexina-V (A) y por el método de extracción de ADN de bajo peso molecular (B). Los paneles A y B muestran el porcentaje de linfocitos apoptóticos de 12 controles sanos, 46 pacientes con EM, 35 pacientes con EM que sufrieron más de dos brotes en los dos años previos al estudio y 11 pacientes con EM que sufrieron dos o menos brotes en los dos años previos al estudio. Los datos muestran media±EEM. (*) indica diferencias significativas $p<0.05$

Cuando se analizó la apoptosis inducida por PHA no se encontraron diferencias significativas entre pacientes con EM y controles sanos ($p=0.158$). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre pacientes con más de dos brotes en los dos años previos al estudio y pacientes con dos o menos brotes ($p=0.140$) (figura 11).

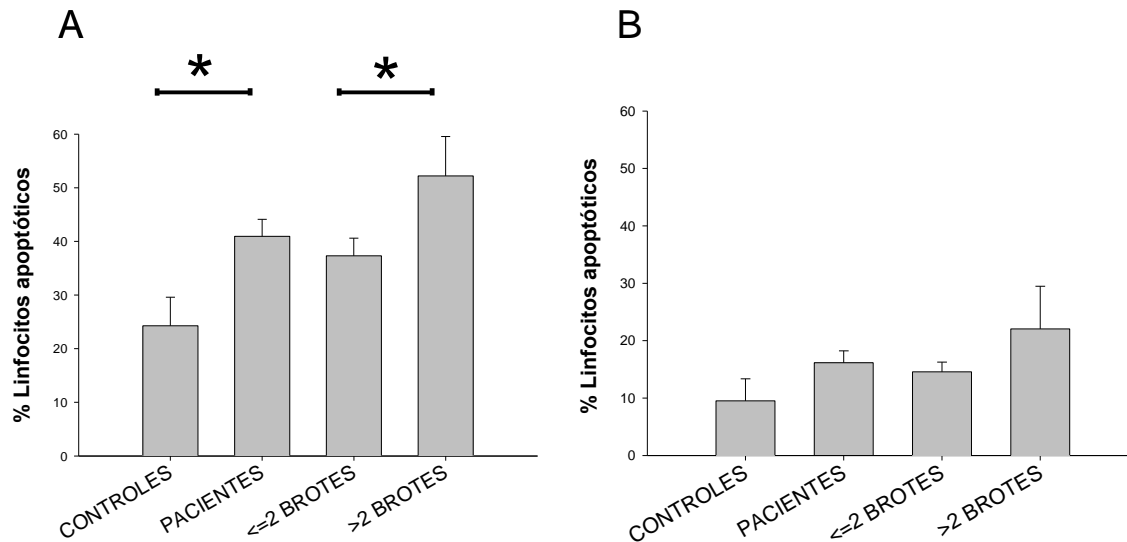


Figura 11. Apoptosis inducida de PBMCs de pacientes con EM y controles sanos medida por unión de anexina-V y extracción de ADN de bajo peso molecular.

Los PBMCs se cultivaron en medio completo en presencia de PHA durante 24h. La apoptosis espontánea se determinó por el método de unión de anexina-V (A) y por el método de extracción de ADN de bajo peso molecular (B). Los paneles A y B muestran el porcentaje de linfocitos apoptóticos de 12 controles sanos, 46 pacientes con EM, 35 pacientes con EM que sufrieron más de dos brotes en los dos años previos al estudio y 11 pacientes con EM que sufrieron dos o menos brotes en los dos años previos al estudio. Los datos muestran media±EEM. (*) indica diferencias significativas $p<0.05$

3.3. ESTUDIO DE CASPASAS ACTIVAS EN LINFOCITOS T DE PACIENTES CON EM

Para determinar si los linfocitos de pacientes con EM morían mediante apoptosis dependiente de caspasas y su ruta o vía de inducción, estudiamos la activación de las caspasas 3, 8 y 9 en seis pacientes de EM y seis controles sanos. El porcentaje de células T positivas para las formas activas de las tres caspasas después de 24 horas de cultivo en

medio completo fue significativamente mayor en los pacientes de EM ($p < 0.001$). Se observó una fuerte correlación entre el porcentaje de células anexina-V positivas y el porcentaje de células positivas para las formas activas de caspasas 3 ($p = 0.001$ $r = 0.999$), 8 ($p = 0.001$ $r = 0.999$) y 9 ($p = 0.002$ $r = 0.998$) tras 24 horas de cultivo.

Para determinar la vía de activación de caspasas en pacientes con EM, estudiamos los porcentajes de células positivas para formas activas de caspasas tras 3 horas de cultivo. Los porcentajes de células positivas para las caspasas 3 y 8 activas fueron dos veces superiores al porcentaje de células positivas para la forma activa de caspasa 9 (figura 12).

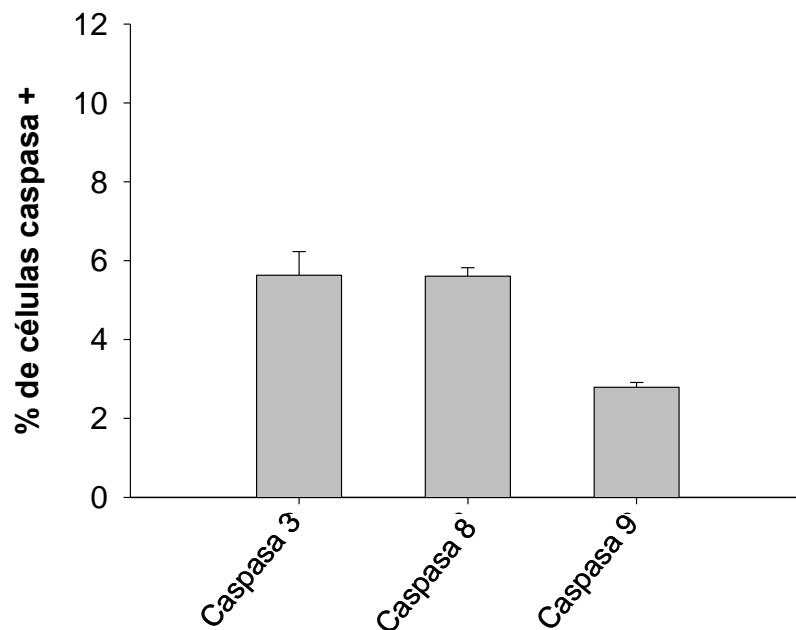


Figura 12. Activación temprana de caspasas en células de pacientes con EM.

Los PBMCs se cultivaron en medio completo durante 3 horas. La detección de células positivas para formas activas de caspasas se realizó mediante el uso de inhibidores de caspasas marcados con fluorocromos (FLICA). La figura muestra el porcentaje de células con formas activas de caspasas 3, 8 y 9 de 6 pacientes con EM. Los datos muestran media \pm EEM.

3.4. ESTUDIO DE EXPRESIÓN Y BLOQUEO DE Fas (CD95)

Una vez demostrado un aumento en la susceptibilidad a la apoptosis espontánea de los linfocitos T de pacientes con EM y un aumento de la activación de caspasa 8 en las primeras horas de cultivo, nos propusimos determinar si este aumento de apoptosis espontánea es debido a un aumento en la apoptosis inducida por Fas. Comparamos el porcentaje de células T que expresaban Fas de 6 pacientes con EM y 6 controles sanos. Aunque este porcentaje fue significativamente mayor en los pacientes con EM ($p < 0.05$), no encontramos ninguna correlación entre el porcentaje de células que expresaban Fas y el porcentaje de células que sufrieron apoptosis tras 24 horas de cultivo ($p = 0.492$ $r = 0.352$). Cuando el antígeno CD95 fue bloqueado mediante la adición de dosis saturantes de anticuerpo anti-CD95 no señalizantes al medio de cultivo, la apoptosis de los linfocitos no disminuyó con respecto a la apoptosis espontánea observada en cultivos sin anticuerpos bloqueantes (figura 13).

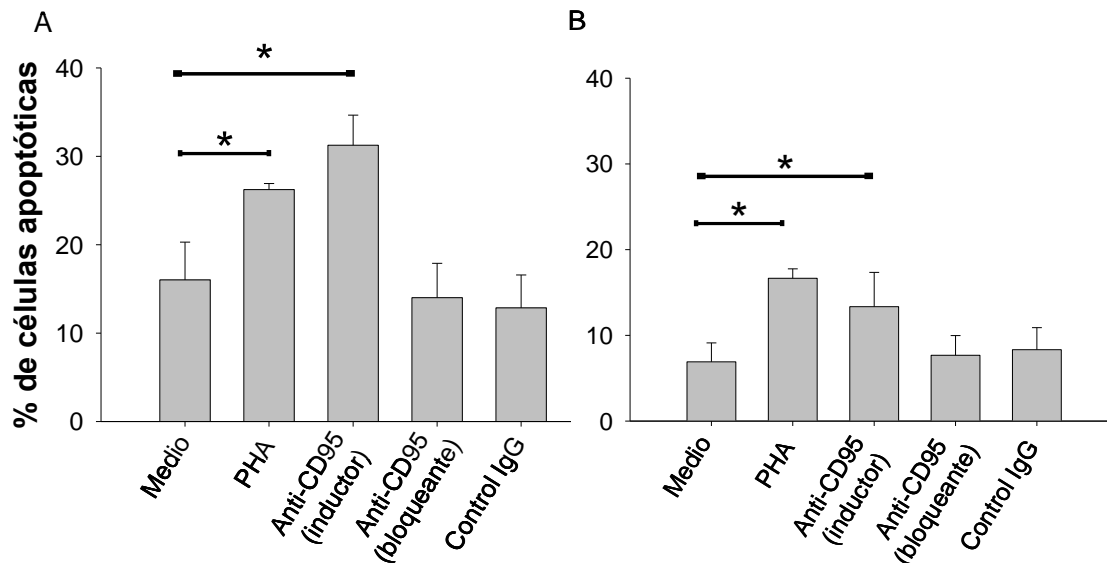


Figura 13. Apoptosis de PBMCs de pacientes con EM y controles sanos en diferentes condiciones de cultivo.

Los PBMCs de 6 pacientes con EM y 6 controles sanos se cultivaron durante 24 horas en medio completo en presencia o ausencia de PHA, anticuerpos anti-CD95 inductores de apoptosis, anticuerpos anti-CD95 bloqueantes y anticuerpos irrelevantes de isotipo IgG. La figura muestra el porcentaje de células apoptóticas de pacientes con EM (A) y de controles sanos (B). * Indica diferencias significativas entre medio y otras condiciones de cultivo (p<0.05)

4. ESTUDIO DE LA APOPTOSIS EN LINFOCITOS DE PACIENTES CON EM DURANTE EL TRATAMIENTO CON IFN β

A continuación estudiamos la apoptosis de linfocitos T y B de pacientes con EM a 1, 6 y 12 meses de tratamiento con IFN β y en los brotes clínicos, antes del tratamiento con esteroides, en aquellos pacientes que sufrieron brotes durante el tratamiento con IFN β .

4.1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON IFN β EN LA APOPTOSIS DE LOS LINFOCITOS T DE PACIENTES CON EM

El tratamiento con IFN β indujo una reducción progresiva y significativa en el porcentaje de linfocitos T apoptóticos. Esta reducción significativa llegó hasta valores de controles sanos en todas las subpoblaciones de linfocitos T. Como puede observarse en la figura 14, el porcentaje de células apoptóticas disminuyó significativamente y se produjo una normalización en las subpoblaciones T CD3+CD4+ y CD4+CD45RA+ después de un mes de tratamiento ($p=0.003$ y $p=0.001$ respectivamente). Para las poblaciones T CD3+, CD8+CD45RA+ y CD4+CD45RO+ el descenso significativo del porcentaje de células apoptóticas se observó a los 6 meses de tratamiento ($p=0.014$, $p=0.016$ y $p=0.05$, respectivamente) mientras que para las subpoblaciones T CD3+CD8+ y CD8+CD45RO+ se observó a los 12 meses de tratamiento ($p=0.002$ y $p=0.001$, respectivamente). La normalización significativa del porcentaje de células apoptóticas ocurrió a 1 mes para las células CD3+, a 6 meses para las células CD3+CD8+ y CD8+CD45RA+ y a los 12 meses para las células CD4+CD45RO+ y CD8+CD45RO+. Los valores de porcentajes de células apoptóticas de las poblaciones de linfocitos B no se modificaron con el tratamiento. En la figura 15 se muestra un ejemplo de análisis por citometría de flujo de linfocitos CD3+CD4+ de un paciente con EM representativo antes y a 1, 6 y 12 meses de tratamiento.

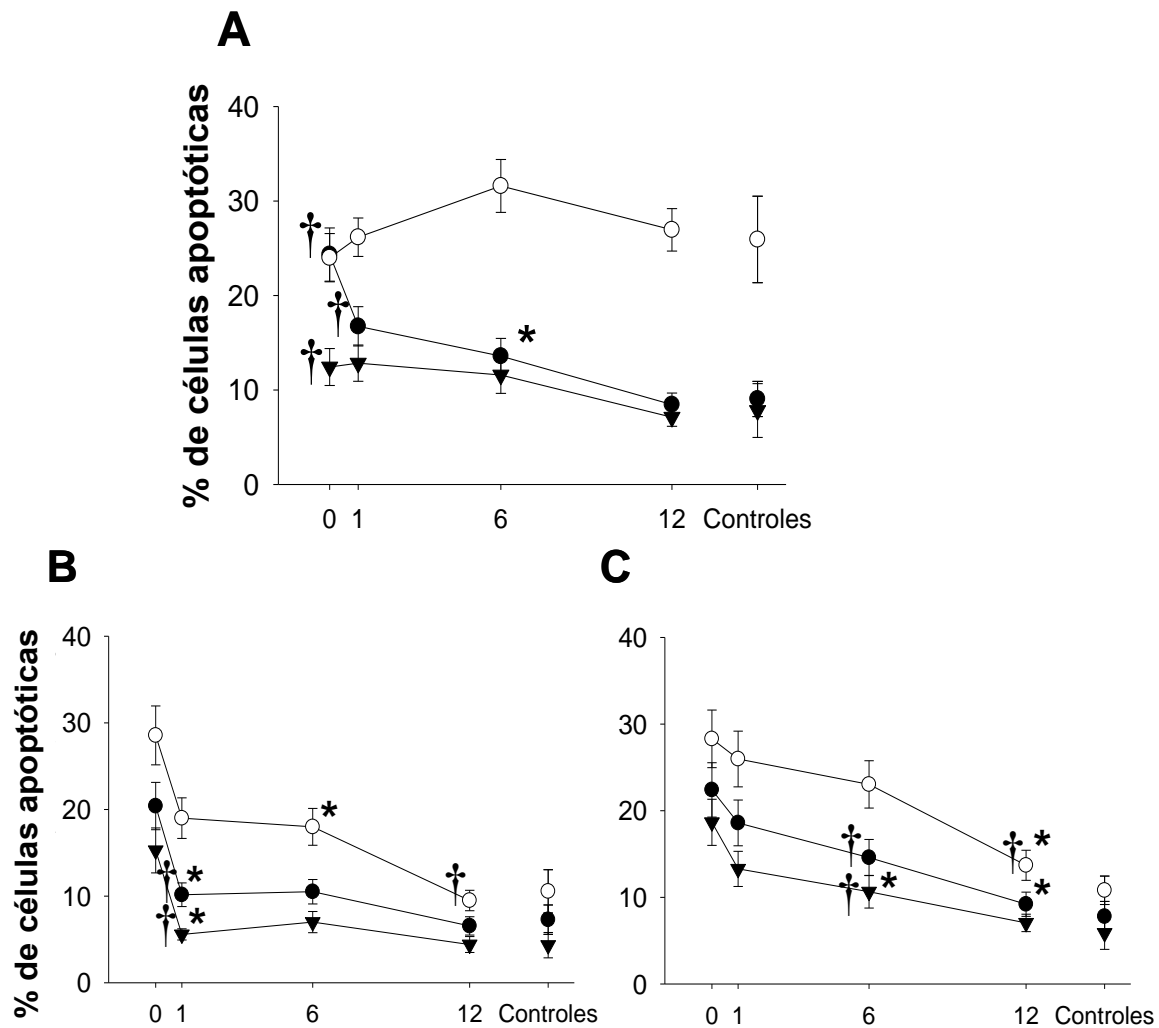


Figura 14. El tratamiento con $IFN\beta$ disminuye la apoptosis espontánea en las poblaciones de células T.

La figura muestra la evolución en el tiempo de los porcentajes de linfocitos apoptóticos de pacientes con EM tratados con $IFN\beta$ y los valores de controles sanos. Se representan como media \pm EEM. El panel A muestra los porcentajes de células apoptóticas dentro de las poblaciones CD3+ (●), CD19+ (○) y CD19+CD5+ (▼). El panel B muestra los porcentajes de células apoptóticas dentro de las poblaciones CD3+CD4+ (●), CD4+CD45RA+ (▼) y CD4+CD45RO+ (○). El panel C muestra los porcentajes de células apoptóticas dentro de las poblaciones CD3+CD8+ (●), CD8+CD45RA+ (▼) y CD8+CD45RO+ (○). * Indica la primera diferencia significativa con respecto a los valores basales. † Indica la primera determinación en la que los porcentajes de células apoptóticas de pacientes con EM no difieren estadísticamente de los valores de controles sanos

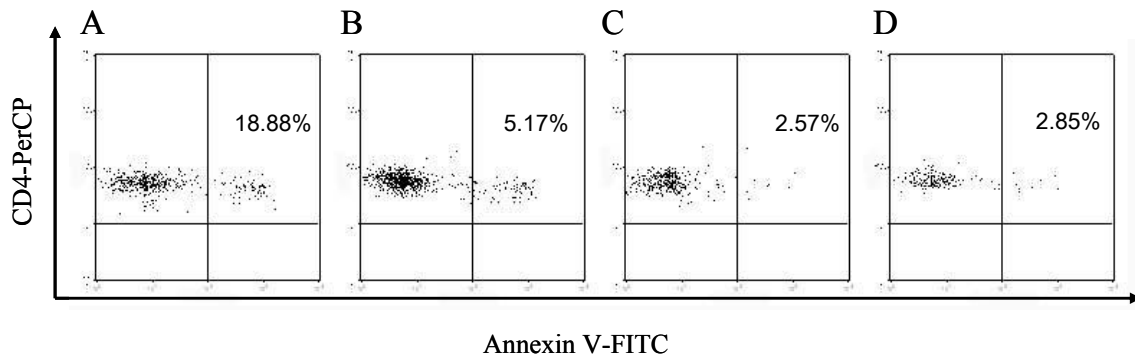


Figura 15. Apoptosis espontánea de células T $CD3+CD4+$ de un paciente con EM representativo durante el tratamiento con $IFN\beta$.

Los linfocitos T $CD3+CD4+$ apoptóticos se identificaron por unión de anexina-V después de 24 horas de cultivo en medio completo. Cada diagrama de puntos representa el porcentaje de linfocitos T $CD3+CD4+$ apoptóticos de un mismo paciente con EM antes del tratamiento (A), a 1 mes de tratamiento (B), a 6 meses de tratamiento (C) y a 12 meses de tratamiento (D).

Cuando se calculó la tasa de apoptosis se encontró un descenso progresivo de la susceptibilidad a la apoptosis espontánea en todas las poblaciones de linfocitos T estudiadas (figura 16). Este descenso fue significativo a los 12 meses de tratamiento con $IFN\beta$ en las poblaciones $CD3+$ ($p<0.001$), $CD3+CD4+$ ($p<0.001$), $CD3+CD8+$ ($p=0.008$), $CD4+CD45RA+$ ($p<0.001$), $CD4+CD45RO+$, ($p<0.001$), $CD8+CD45RA+$ ($p<0.001$) y $CD8+CD45RO+$ ($p=0.006$). La susceptibilidad a la apoptosis espontánea se normalizó a los 12 meses de tratamiento en todas las poblaciones de linfocitos T.

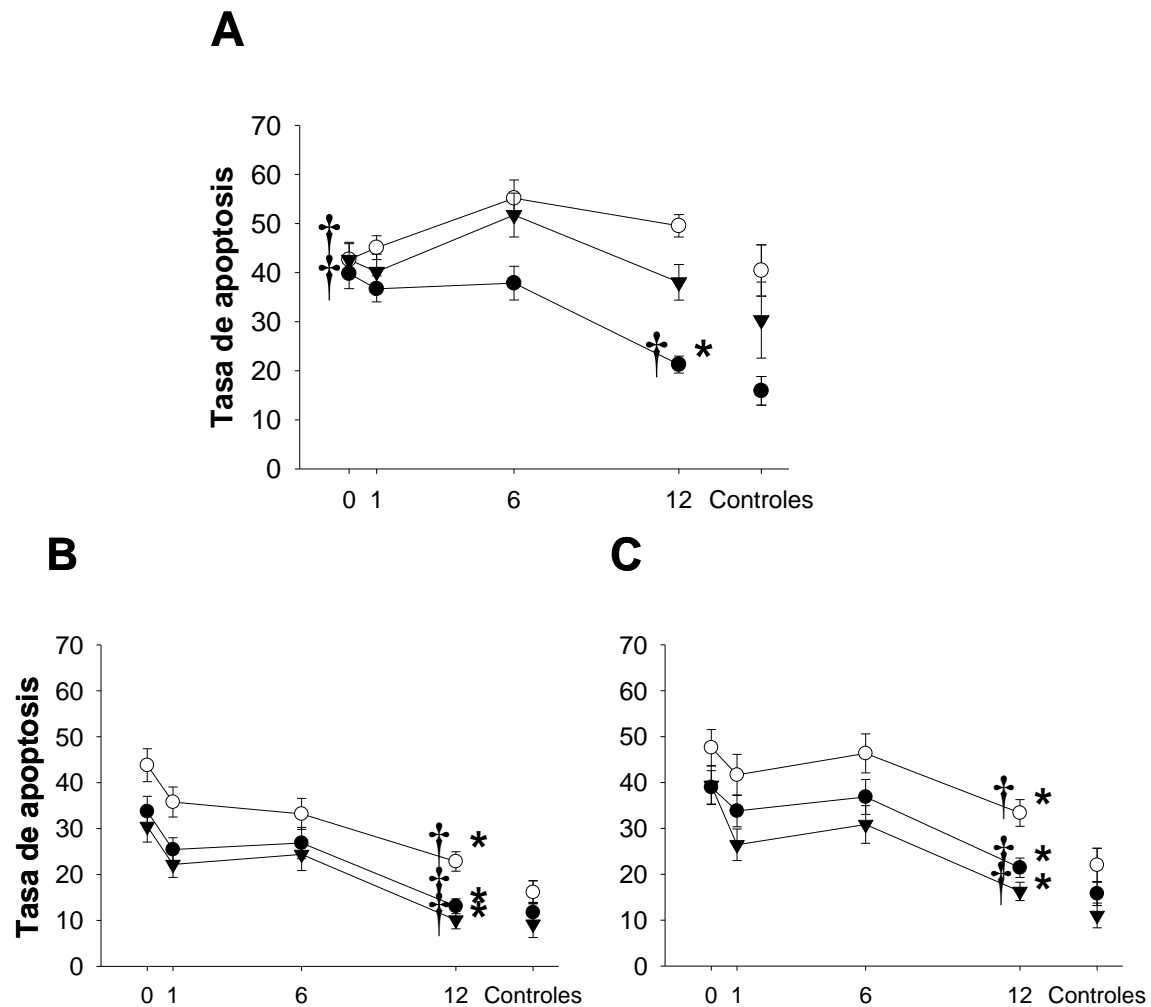


Figura 16. Disminución de la tasa de apoptosis espontánea durante el tratamiento con $IFN\beta$.

La figura muestra la evolución en el tiempo de la tasa de apoptosis de pacientes con EM tratados con $IFN\beta$ y los valores de controles sanos. Se representan como media \pm EEM. El panel A muestra la tasa de apoptosis de células dentro de las poblaciones CD3+ (●), CD19+ (○) y CD19+CD5+ (▼). El panel B muestra la tasa de apoptosis de células dentro de las poblaciones CD3+CD4+ (●), CD4+CD45RA+ (▼) y CD4+CD45RO+ (○). El panel C muestra la tasa de apoptosis de células dentro de las poblaciones CD3+CD8+ (●), CD8+CD45RA+ (▼) y CD8+CD45RO+ (○). * Indica la primera diferencia significativa con respecto a los valores basales. † Indica la primera determinación en la que la tasa de apoptosis de pacientes con EM no difiere estadísticamente de los valores de controles sanos

Después de 12 meses de tratamiento con IFN β , la proporción de pacientes con EM con valores de apoptosis espontánea por encima del rango superior de los controles sanos disminuyó significativamente en todas las poblaciones T estudiadas (tabla 4).

Tabla 4. *Pacientes con valores de apoptosis espontánea por encima del rango de controles sanos después del tratamiento con IFN β*

	Controles Sanos	Pacientes por encima del límite superior	
	Rango de Células apoptóticas (mínimo %-máximo %)	Basal n=46 Número (%)	Post-tratamiento n=46 Número (%)
CD3+	(3.61-16.28)	26 (56%)	5 (11%)*
CD3+CD8+	(2.57-12.42)	26 (56%)	7 (15%)*
CD3+CD4+	(1.71-13.53)	23 (50%)	5 (11%)*
CD4+CD45RA+	(0.91-7.53)	27 (58%)	6 (13%)*
CD8+CD45RA+	(1.61-8.24)	30 (65%)	11 (23%)*
CD4+CD45RO+	(2.90-21.59)	20 (44%)	4 (9%)*
CD8+CD45RO+	(3.37-16.75)	26 (56%)	12 (26%)*
CD19+	(10.71-55.49)	2 (4%)	1 (2%)
CD19+CD5+	(0.77-13.99)	13 (29%)	6 (13%)†
Extracción de ADN	(0.35-13.41)	23 (50%)	15 (33%)†

Los datos muestran los números y los porcentajes de pacientes con EM cuyos valores de apoptosis espontánea estaban por encima del límite superior del rango de los controles sanos. La apoptosis de los linfocitos T estaba aumentada en más de la mitad de los pacientes antes del comienzo del tratamiento. Después de 12 meses de tratamiento con IFN β , la proporción de pacientes con valores por encima del límite superior disminuyó significativamente en todas las poblaciones T y en la población CD19+CD5+. Se obtuvieron resultados similares cuando la apoptosis se midió por extracción de ADN de bajo peso molecular.* Indica un valor de $p < 0.01$ y † Indica un valor de $p < 0.05$ entre pacientes antes del tratamiento y pacientes después de 12 meses de tratamiento.

4.2. ESTUDIO DE LA APOPTOSIS ESPONTÁNEA EN PACIENTES CON BROTES CLÍNICOS DURANTE EL TRATAMIENTO CON IFN β

La apoptosis espontánea se estudió también en 8 pacientes con EM que sufrieron algún brote clínico durante los 12 meses de tratamiento con IFN β . Observamos que durante el brote se producía un aumento de la apoptosis espontánea hasta llegar a los porcentajes observados antes del tratamiento con IFN β (figura 17). Este aumento de apoptosis se observó en todas las poblaciones de linfocitos. La susceptibilidad a apoptosis espontánea durante el brote fue significativamente mayor que la observada en la siguiente visita del paciente ($p < 0.05$) (figura 17). En la figura 16 se muestran los diagramas de puntos de un paciente representativo con EMRR que mostró un brote clínico durante el tratamiento.

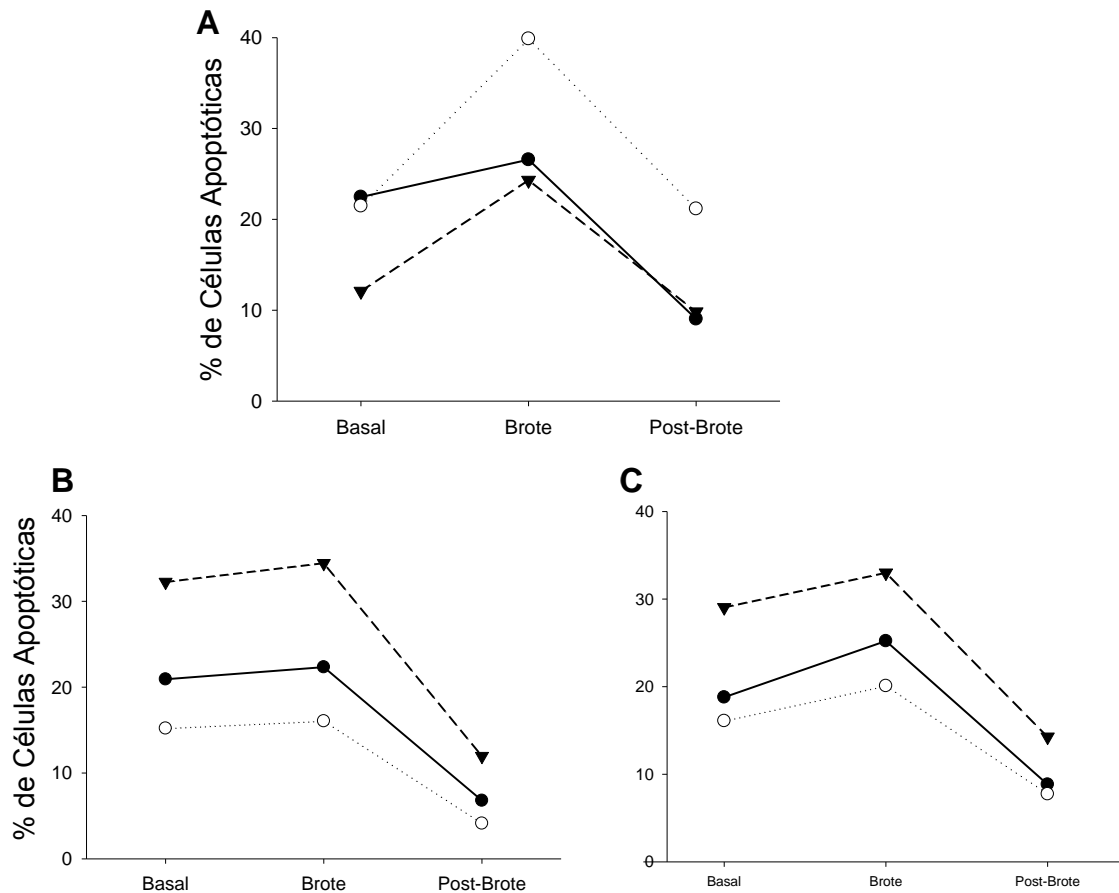


Figura 17. La apoptosis espontánea de las células T de pacientes con EM aumenta durante el brote clínico.

Evolución en el tiempo de la media del porcentaje de células apoptóticas de varias poblaciones de linfocitos de 8 pacientes con EM que sufrieron brote clínico durante el tratamiento con IFN β . El panel A muestra los porcentajes de células apoptóticas dentro de las poblaciones CD3+ (●), CD19+ (○) y CD19+CD5+ (▼). El panel B muestra los porcentajes de células apoptóticas dentro de las poblaciones CD3+CD4+ (▼), CD4+CD45RA+ (○) y CD4+CD45RO+ (●). El panel C muestra los porcentajes de células apoptóticas dentro de las poblaciones CD3+CD8+ (▼), CD8+CD45RA+ (○) y CD8+CD45RO+ (●). (Basal) Valor antes de comenzar el tratamiento con IFN β , (Brote) Valor durante el brote, (Post-Brote) Valor en la siguiente visita programada después del brote * Indica una reducción significativa de los valores después del brote respecto a los valores durante el brote.

DISCUSIÓN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica, inflamatoria y desmielinizante del sistema nervioso central de etiología desconocida aunque está aceptada la participación patogénica del sistema inmunitario en el proceso de desmielinización (Pettinelli CB, 1981; Genain CP, 1999). Numerosos trabajos han propuesto la idea de que en la EM existe una deficiencia de la apoptosis linfocitaria que contribuye a una eliminación defectuosa y, por tanto, una expansión de células autorreactivas en el SNC (Bauer J, 1995; Pender, 1998; Zettl UK, 1998; Sharief MK, 2002). En esta tesis se demuestra, sin embargo, que los linfocitos de sangre periférica de pacientes con EM no presentan una resistencia a apoptosis. Es más, las determinaciones de esta forma de muerte celular realizadas mediante dos métodos de cuantificación diferentes (porcentaje y tasa de apoptosis) y tres técnicas independientes (marcaje con anexina-V, contenido de ADN y activación de caspasas) han revelado una elevada apoptosis espontánea *ex vivo* en los linfocitos T de pacientes con EMSP y EMRR en comparación a la de controles sanos. Además, se demuestra que, tras 12 meses de tratamiento con IFN β , la incidencia de este modo de muerte celular en los linfocitos T de pacientes con EM es comparable a la de controles sanos. Por tanto, la terapia con IFN β se asocia a una reducción de la apoptosis linfocitaria *ex vivo* en los pacientes.

Distribución anormal de células T en los linfocitos de sangre periférica de pacientes con EM

En este trabajo hemos encontrado un descenso en el porcentaje total de linfocitos T y un aumento significativo en la relación de células T CD4/CD8 en sangre periférica de pacientes con EM. Numerosos trabajos han descrito una reducción en la proporción de células T CD8 circulantes en pacientes con EM (Reinherz EL, 1980; Antel JP, 1984; Ilonen J, 1990; 75; Kreuzfelder E, 1992; Michałowska-Wender G, 2006) que fue interpretada en un primer momento como una disminución en el número de células supresoras (Reinherz EL, 1980). Dado que los linfocitos T CD8 superan en número a otras poblaciones de células infiltradas en el parénquima cerebral de pacientes con EM (Hauser SL, 1986; Neumann H, 2002), y que los que exhiben un fenotipo memoria,

muestran una mayor capacidad para ser reclutados en las vénulas cerebrales inflamadas durante las fases agudas de la enfermedad (Battistini L, 2003), la existencia de una reducción selectiva en el número de linfocitos T CD8 en la sangre periférica de pacientes con EM puede ser interpretada como una consecuencia del papel patológico de la infiltración de estas células en el SNC (Haring JS, 2002).

Otra posible explicación a esta alteración en la relación entre las poblaciones de linfocitos T CD4 y CD8 sería la existencia de una deficiencia genética de linfocitos T CD8. Se sabe que el ratio CD4/CD8 en los linfocitos T está controlado genéticamente (Amadori A, 1995) y que algunos de los genes responsables están localizados en el complejo HLA (Ferreira MA, 2010). Un menor número de linfocitos T CD8 podría explicar como la infección por EBV es capaz de causar EM, ya que, una respuesta insuficiente contra linfocitos B infectados por EBV facilitaría, en individuos con genes del complejo HLA de clase II asociados con la enfermedad, la expansión clonal y el acumulo progresivo de estas células en el SNC y, finalmente, la activación de linfocitos T autorreactivos que orquestarían una reacción autoinmune que conduciría al desarrollo de la EM (Pender MP, 2011). Como el número de linfocitos T CD8 disminuye normalmente con la edad (Amadori A, 1995; Hall MA, 2000), la deficiencia de estas células se agravaría en cada paciente lo que podría explicar la acumulación de discapacidad dependiente de la edad en los pacientes (Confavreux C, 2006).

La susceptibilidad a apoptosis espontánea está aumentada en los linfocitos T de pacientes con EM

En este estudio hemos encontrado una alteración funcional en los linfocitos T de pacientes con EM caracterizada por un aumento en la susceptibilidad a apoptosis espontánea *ex vivo*. Las diferencias entre pacientes y controles sanos en términos de porcentaje de células apoptóticas no fueron significativas en células frescas sin cultivar. Sin embargo, la proporción de células que sufrieron apoptosis espontánea tras 24 horas de cultivo *ex vivo* fue entre 2 y 4 veces mayor en las subpoblaciones de linfocitos T de pacientes con EM, mientras que no se hallaron diferencias en el compartimento B

circulante. Este patrón diferente entre células frescas y cultivadas se puede explicar por mecanismos *in vivo* de eliminación de las células que están experimentando apoptosis (Fadok VA, 1992) y la pérdida de las células muertas en el proceso de separación de PBMCs (Böyum AJ, 1968) y los diferentes lavados de la técnica usada para la cuantificación de la apoptosis (Prieto A, 2002). Hay que tener en cuenta que el método que se utiliza para detectar la muerte celular *ex vivo* reconoce la fosfatidil serina traslocada que es identificada por la misma proteína *in vivo*. Una eliminación continua de células apoptóticas *in vivo* y la pérdida de las muertas durante la separación pueden ser responsables de que en la fracción de células frescas se observe menor incidencia de muerte y de que las diferencias entre pacientes con EM y controles sanos desaparezcan. La ausencia de señales rescatadoras y mecanismos de limpieza de células que están experimentando apoptosis en los cultivos explicarían la rápida acumulación de células apoptóticas *ex vivo* en pacientes con EM.

Los resultados de este trabajo muestran un aumento en el porcentaje de apoptosis inducida por mitógeno en los linfocitos T de pacientes con EM respecto a los de controles sanos. Sin embargo, el hecho de que estas diferencias desaparezcan al sustraer la proporción de células apoptóticas debida a la que se produce espontáneamente, revela que este incremento no se debe a una mayor sensibilidad de los linfocitos a AICD sino a la propia susceptibilidad a experimentar apoptosis espontánea que tienen estas células. De hecho, cuando se analiza la tasa de apoptosis, un método más sensible que la medida del porcentaje de células apoptóticas (Prieto A, 2002; Díaz D, 2006), no se encuentran diferencias significativas en la apoptosis inducida entre los linfocitos de pacientes con EM y los de controles sanos.

El incremento en la muerte celular hallado en este trabajo está mediado por la acción de cisteinil-aspartato-proteasas esenciales en el programa de apoptosis ya que hemos observado que, tras 24 horas de cultivo, los linfocitos T de pacientes con EM presentan mayor proporción de células positivas para las formas activas de las caspasas 3, 8 y 9 que correlaciona positivamente con el porcentaje de células que se unieron a anexina-V.

Los experimentos cinéticos de activación de caspasas han demostrado que existe una mayor proporción de caspasa 8 activa tras 3 horas de cultivo. Este hallazgo, junto con el incremento significativo en el porcentaje de células que expresaron Fas encontrado en los

pacientes con EM, podría llevar a pensar que el aumento en la apoptosis espontánea observado sería debido a una señalización a través de este receptor de muerte que activaría la vía extrínseca. Sin embargo, la falta de correlación entre la expresión de Fas y el porcentaje de linfocitos T apoptóticos, y la incapacidad de los anticuerpos anti-Fas bloqueantes para prevenir la apoptosis espontánea demuestran su no depende de interacciones Fas-FasL en el cultivo. Por lo tanto, la ruta principal implicada en el incremento de apoptosis es la vía extrínseca mediada por la activación de caspasa 8 pero independiente de la señalización a través Fas. Sería necesario un estudio más exhaustivo para determinar otros receptores de muerte (Koornstra JJ, 2005; Jin Z, 2006; Badiola N, 2009) u otras rutas más directas (Thierry F, 2008) que puedan estar envueltos en la activación de la caspasa 8 en los linfocitos T de pacientes con EM.

La apoptosis de linfocitos T es un mecanismo de control que actúa tanto en la tolerancia a antígenos propios como en la finalización en las respuestas a antígenos extraños. La reacción de los linfocitos T a las señales de activación depende de un balance que determina la supervivencia de la célula o la iniciación de un proceso de apoptosis (Jaleco S, 2003). Esta dicotomía controla la expansión o retracción de los clones antígeno específicos y puede tener implicaciones fisiológicas y patológicas (Thome M, 2001). Una activación inadecuada de los linfocitos T normalmente conduce a un estado de susceptibilidad a apoptosis (Madakamutil LT, 2003; Mabrouk I, 2008). De hecho, en varias enfermedades alérgicas, autoinmunes o infecciosas se ha demostrado una apoptosis *ex vivo* que está acrecentada en los linfocitos T de sangre periférica (Pantaleo G, 1993; Perniok A, 1998; Henandez MP, 1999; Graninger WB, 2000; Grondal G, 2002; Grzegorzcyk J, 2002). La causa última de este aumento de apoptosis de linfocitos T en enfermedades inflamatorias es incierta y se han propuesto diferentes mecanismos (Henandez MP, 1999; Graninger WB, 2000; Grondal G, 2002; Grzegorzcyk J, 2002). Por otra parte, el incremento en esta forma de muerte celular en linfocitos T en estas patologías podría estar relacionado con la intensidad de las reacciones inflamatorias. Se ha propuesto, además, que un incremento de la apoptosis de linfocitos de sangre periférica puede ser la causa de estados linfopénicos que pueden llegar a provocar la aparición de enfermedades autoinmunes (Marleau AM, 2005; Baccala R, 2005). El crecimiento homeostático de los linfocitos para contrarrestar la linfopenia es un mecanismo natural de

crecimiento que depende de interacciones con antígenos propios y que podría estar implicado en un aumento de la supervivencia y proliferación de células autorreactivas. Por lo tanto, un aumento en la muerte de linfocitos podría ser la causa de un estado linfopénico que activaría un proceso de crecimiento homeostático en el que se favorece la expansión clonal de células T autorreactivas que, en individuos con predisposición genética, podrían iniciar enfermedades autoinmunes (Johannisson A, 1995; Marleau AM, 2005; Baccala R, 2005).

Muchos trabajos han descrito mayor susceptibilidad a apoptosis de las células T activadas (Pantaleo G, 1993; Grzegorzczak J, 2002). Por lo tanto, los datos recogidos en este estudio se podrían relacionar con un aumento en el porcentaje de células T memoria activadas. De acuerdo con esta interpretación hemos observado mayores proporciones de células apoptóticas en las poblaciones CD45RO⁺ tanto de linfocitos T CD4 como de T CD8 en los pacientes con EM. Dado que la expresión de la isoforma CD45RO está restringida a células T previamente activadas (Johannisson A, 1995), este aumento de apoptosis se asocia a un mayor grado de activación de los linfocitos T CD4 y CD8. Sin embargo, se ha encontrado apoptosis espontánea elevada también en aquellas poblaciones T, CD4 y CD8, que expresaban la isoforma CD45RA que no es exclusiva de células previamente activadas.

El papel de la muerte celular programada en la patogenia de la EM ha sido ampliamente discutido. El aumento en la apoptosis espontánea de los linfocitos T en pacientes con EM y la asociación de esta elevada muerte celular con la actividad de la enfermedad, hallados en este trabajo, no apoyan la ya extendida idea de que la supervivencia anormal de los linfocitos T causada por una mayor resistencia a la apoptosis juega un papel patológico importante en la EM (Bauer J, 1995; Pender M, 1998; Sharief MK, 2002).

La diferencia en los resultados de estas publicaciones que describen una apoptosis reducida de células T de pacientes con EM con los de este estudio puede explicarse por el método de cultivo elegido. En este trabajo se han utilizado cultivos de células frescas *ex vivo* que reflejan la susceptibilidad de la células a experimentar apoptosis, sin embargo, en otras investigaciones se ha cuantificado la apoptosis tras varios días de cultivo con estimulación *in vitro* (Kaser A, 1999; Sharief MK, 2000; Sharief MK, 2002). En estos cultivos, la medida de apoptosis no sólo subestima la fracción de células que ya iniciaron

esta forma de muerte celular en los primeros días de cultivo sino que además se realiza sobre células en proliferación más resistentes a apoptosis y, por lo tanto, no refleja la susceptibilidad real a iniciar el programa que conducirá a la muerte de la célula en un entorno real.

En varias publicaciones se ha descrito un aumento en la expresión de genes cuyos productos tienen actividad antiapoptótica en los linfocitos de sangre periférica de pacientes con EM (Sharief MK, 2000; Sharief MK, 2002; Sharief MK, 2003; Banisor I, 2004; Hebb AL, 2008). Sin embargo, la regulación de la muerte celular programada depende de un complejo balance entre la cantidad de proteínas pro y anti-apoptóticas de forma que un aumento en la cantidad de una o varias proteínas con actividad anti-apoptótica no se relaciona necesariamente con una resistencia celular a la apoptosis (Graninger WB, 2000). Además, en estos trabajos no se realiza un análisis simultáneo de la incidencia de la muerte celular espontánea en linfocitos de sangre periférica. Los resultados de esta tesis muestran un claro incremento en la susceptibilidad a apoptosis espontánea en células T de sangre periférica de pacientes con EM no tratados y, por lo tanto, el aumento en la expresión de algunos mecanismos antiapoptóticos descritos podría representar una reacción homeostática insuficiente e ineficiente a la apoptosis elevada de linfocitos T de pacientes con EM. Habría que apuntar además, que los pacientes con mutaciones que inactivan genes responsables de la inducción de muerte celular en linfocitos así como los animales knock-out para estos genes, presentan un incremento en el número absoluto de linfocitos T de sangre periférica (Adachi M, 1996). Si la EM fuera desencadenada por una anómala reducción de la apoptosis linfocitaria cabría esperar un aumento significativo de la cifra de linfocitos en sangre en los pacientes con EM. Sin embargo, la evidencia contradice esta predicción e indica lo contrario y esto es que los pacientes de EM no suelen presentar linfocitosis sino que, en su lugar, muestran habitualmente distintos niveles de linfopenia (Kreuzfelder E, 1992).

No se puede establecer el significado patogénico del aumento de la apoptosis espontánea de células T descrita en este trabajo. El incremento de la susceptibilidad a apoptosis *ex vivo* ocurre en todas poblaciones de linfocitos T estudiadas. Hay que remarcar que los linfocitos B CD19+ no se ven afectados por la elevada muerte celular. El carácter

generalizado de la alteración en los linfocitos T sugiere que el aumento en la apoptosis espontánea no es exclusivo de células T autorreactivas.

La alteración en la regulación de la muerte celular observada en los pacientes con EM es clínicamente significativa ya que correlaciona positivamente con el número de brotes clínicos en los dos años previos al estudio, además, el incremento en la apoptosis se observó en las dos formas clínicas de EM estudiadas (EMRR y EMSP). Además, aquellos pacientes con EMSP que no tuvieron brotes en los dos años previos al estudio, presentaron valores normales de apoptosis espontánea. En conjunto, nuestros hallazgos indican que el aumento en la susceptibilidad a este modo de muerte celular espontánea es una anomalía del compartimento de linfocitario T que, como discutiremos más adelante, está asociada a la actividad inflamatoria de la enfermedad.

El tratamiento con IFN β normaliza la apoptosis de linfocitos T de pacientes con EM

En este trabajo se han encontrado efectos significativos de la terapia con IFN β sobre la apoptosis espontánea de los linfocitos T de sangre periférica de pacientes con EM. El tratamiento es capaz de normalizar significativamente la alta susceptibilidad a iniciar el programa de muerte celular que hemos observado en estos linfocitos.

El número de pacientes con valores de apoptosis por encima del límite superior del rango encontrado en los controles sanos se reduce de un 55% a un 15% de los pacientes tras un año de tratamiento con IFN β . Este efecto inmunomodulador de la terapia con IFN β es gradual y ocurre a diferente ritmo dependiendo de la subpoblación estudiada; los linfocitos T CD4 alcanzan valores dentro del rango de los controles sanos después de un mes de tratamiento mientras que los T CD8 no llegan a la normalidad hasta después de 6 meses de tratamiento. De la misma manera, las subpoblaciones CD45RA⁺ tanto de linfocitos T CD4 como T CD8, muestran valores normales antes que la subpoblaciones CD45RO⁺. Además, la terapia con IFN β no afecta a la apoptosis de los linfocitos B CD19⁺ una población que no presentaba alteraciones en la susceptibilidad a iniciar esta forma de muerte celular.

Algunos trabajos han descrito un aumento en la apoptosis de linfocitos de pacientes con EM tras el tratamiento con IFN β (Sharief MK, 2002; Gniadek P, 2003). La diferencia con los resultados obtenidos en nuestro estudio se podría atribuir a los procedimientos experimentales usados para determinar la incidencia de la apoptosis. Sharief et al. han descrito aumentos en la expresión de proteínas antiapoptóticas (Sharief MK, 2002) que disminuyen tras la terapia con IFN β (Sharief MK, 2002). Sin embargo, en esta investigación no se determina, simultáneamente a la cuantificación de proteínas reguladoras de la apoptosis, la incidencia de este modo de muerte celular en los linfocitos sino otros parámetros como la fragmentación de ADN o la expresión de Fas que no son medidas directas de la proporción de células que están experimentando un proceso de apoptosis. Gniadek et al. realizaron un estudio de la apoptosis espontánea de linfocitos a nivel de célula individual (Gniadek P, 2003). Este trabajo, sin embargo, fue llevado a cabo en células tras un proceso de congelación y descongelación, un procedimiento técnico que puede causar variaciones en la susceptibilidad a la muerte celular de los linfocitos. De hecho, un análisis a su procedimiento de validación de la técnica muestra un coeficiente de variación medio del 44% entre muestras replicadas frescas y congeladas. Este es un valor alto para la evaluación de diferencias sutiles en los porcentajes de células apoptóticas antes y después del tratamiento (1,1%) considerando que la variación media de esta medida entre cada par de muestras replicadas de las fracciones frescas y congeladas fue de un 6%.

Con los resultados de esta tesis no se puede establecer el mecanismo por el que el tratamiento con IFN β regula la apoptosis de linfocitos T de pacientes con EM. El IFN β podría ejercer su acción mediante efectos directos sobre los linfocitos T o bien actuar indirectamente a través de otras células del sistema inmunitario implicadas en la respuesta inflamatoria. Los interferones de tipo I, como el IFN β , previenen una muerte rápida de células T activadas (Marrack P, 1999) sin embargo, podrían ser más relevantes sus efectos en la inhibición de la activación y la proliferación de linfocitos T o sus efectos en la modulación de su producción de citoquinas hacia un fenotipo anti-inflamatorio (Jiang H, 1995; Yong VW, 1998). Se ha observado que el IFN β puede reducir la expresión de las moléculas MHC de clase II e impedir interacciones B7/CD28 y CD40/CD40L por lo que reduce la activación de linfocitos T (Jiang H, 1995; Genc K,

1997; Teleshova N, 2000), además, el IFN β potencia respuestas antiinflamatorias Th2, inhibe el efecto de la IL12 en linfocitos T reactivos frente a proteína básica de mielina (Wang X, 2000) y aumenta los niveles de IL10 en pacientes respondedores a la terapia (Graber JJ, 2007).

El hecho de que los pacientes que sufrieron brotes durante el tratamiento con IFN β , que mostraron un aumento marcado de la apoptosis espontánea durante el brote, normalizaran los valores de ésta tras la recidiva, sugiere un efecto del IFN β en la susceptibilidad a la muerte celular incluso en estos pacientes. Nuestros datos muestran que la terapia con IFN β en los pacientes con EM tiene un efecto inmunomodulador en el compartimento de linfocitos T circulantes con restauración de los niveles normales de apoptosis espontánea.

Asociación de la apoptosis espontánea con la actividad de la EM

Se ha demostrado que en muchas enfermedades autoinmunes, alérgicas e infecciosas un aumento de la apoptosis *ex vivo* de linfocitos T de sangre periférica (Grondal G, 2002; Silvestris F, 2003; Grzegorzczuk J, 2002) y que el incremento de este modo de muerte celular puede estar relacionado con la intensidad de las reacciones inflamatorias. Si fuera el caso en los pacientes con EM, la elevada apoptosis observada debería estar asociada con la actividad de la enfermedad. En este trabajo hemos observado esta asociación en tres hechos: 1) El aumento en la susceptibilidad a apoptosis espontánea fue mayor en los linfocitos de pacientes con mayor número de brotes clínicos durante los dos años anteriores al estudio, además, existe una correlación significativa entre la proporción de células apoptóticas en pacientes con EM antes de comenzar el tratamiento con IFN β y el número de brotes que sufrieron éstos durante los dos años previos a la terapia, 2) Los pacientes con EMSP que no sufrieron ningún brote durante los dos años previos al estudio presentaron valores normales de apoptosis espontánea y 3) los pacientes que sufrieron recidivas aun cuando estaban recibiendo tratamiento con IFN β mostraron un marcado incremento en el porcentaje de células apoptóticas durante el brote. El aumento de la apoptosis espontánea ocurre en todas las subpoblaciones de linfocitos T estudiadas

lo que indica una reacción proapoptótica de las células T de sangre periférica al entorno inflamatorio. Este incremento generalizado, se asocia al nivel de la actividad inflamatoria de la EM tanto durante el tratamiento con IFN β como en ausencia del mismo.

CONCLUSIONES

De nuestro estudio del compartimento linfocitario circulante de pacientes con EM se concluye que:

- 1- La enfermedad se asocia a una reducción de la proporción de linfocitos T circulantes determinada por una disminución preferencial de la subpoblación CD3+CD8+.
- 2- Se objetiva un incremento selectivo de la susceptibilidad a la apoptosis del compartimento T con afectación de las poblaciones CD3+CD4+ y CD3+CD8+ así como de las subpoblaciones naive y memoria sin compromiso del compartimento B.
- 3- El aumento de la apoptosis linfocitaria T se debe a una activación preferencial de la vía extrínseca.
- 4- La intensidad de la susceptibilidad a la muerte celular programada del compartimento T circulante se relaciona con la actividad de la enfermedad y con el número de brotes sufridos por el enfermo.
- 5- El tratamiento con IFN β induce una disminución progresiva y alcanza la normalización de la susceptibilidad a apoptosis de los linfocitos T sin afectar al compartimento B.
- 6- Los brotes de enfermedad se asocian a un incremento transitorio de la apoptosis linfocitaria T y B.

BIBLIOGRAFÍA

Adachi M, Suematsu S, Suda T, Watanabe D, Fukuyama H, Ogasawara J, Tanaka T, Yoshida N, Nagata S. Enhanced and accelerated lymphoproliferation in Fas-null mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1996; **93**(5):2131-6.

Akkad DA, Hoffjan S, Petrasch-Parwez E, Beygo J, Gold R, Epplen JT. Variation in the IL7RA and IL2RA genes in German multiple sclerosis patients. **J Autoimmun** 2009; **32**(2):110-5.

Amadori A, Zamarchi R, De Silvestro G, Forza G, Cavatton G, Danieli GA, and others. Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. **Nat Med** 1995; **1**:1279-83.

Anderson MS, Venzani ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, von Boehmer H, Bronson R, Dierich A, Benoist C, Mathis D. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. **Science** 2002; **298**(5597):1395-401.

Ando DG, Clayton J, Kono D, Urban JL, Sercarz EE. Encephalitogenic T cells in the B10.PL model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) are of the Th-1 lymphokine subtype. **Cell Immunol** 1989; **124**(1):132-43.

Antel J. Multiple sclerosis--emerging concepts of disease pathogenesis. **J Neuroimmunol** 1999; **98**(1):45-8.

Antel JP, Peeples DM, Reder AT, Arnason BGW. Analysis of T regulator cell surface markers and functional properties in multiple sclerosis. **J Neuroimmunol** 1984; **6**:93-103.

Archelos JJ, Storch MK, Hartung HP. The role of B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. **Ann Neurol** 2000; **47**(6):694-706.

Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis: the role of endonuclease. **Am J Pathol** 1990; **136**:593-608.

Asano M, Kuwako M, Nomura Y, Suzuki Y, Shibuya M, Sugita K, Ito K. Possible mechanism of the potent vasoconstrictor responses to ryanodine in dog cerebral arteries. **Eur J Pharmacol** 1996; **311**(1):53-60.

Baccala R, Theofilopoulos AN. The new paradigm of T-cell homeostatic proliferation-induced autoimmunity. **Trends Immunol** 2005; **26**(1):5-8.

Badiola N, Malagelada C, Llecha N, Hidalgo J, Comella JX, Sabriá J, Rodríguez-Alvarez J. Activation of caspase-8 by tumour necrosis factor receptor 1 is necessary for caspase-3 activation and apoptosis in oxygen-glucose deprived cultured cortical cells. **Neurobiol Dis** 2009; **35**(3):438-47.

Banisor I, Kalman B. Bcl-2 and its homologues in the brain of patients with multiple sclerosis. **Mult Scler** 2004; **10**(2):176-81.

Battistini L, Piccio L, Rossi B, Bach S, Galgani S, Gasperini C, Ottoboni L, Ciabini D, Caramia MD, Bernardi G, Laudanna C, Scarpini E, McEver RP, Butcher EC, Borsellino G, Constantin G: CD8⁺ T cells from patients with acute multiple sclerosis display selective increase of adhesiveness in brain venules: A critical role for P-selectin glycoprotein ligand-1. **Blood** 2003; **101**:4775–4782.

Bauer J, Wekerle H, Lassmann H. Apoptosis in brain-specific autoimmune disease. **Curr Opin Immunol** 1995; **7**:839–843.

Bell SE, Goodnow CC. A selective defect in IgM antigen receptor synthesis and transport causes loss of cell surface IgM expression on tolerant B lymphocytes. **EMBO J** 1994; **13**(4):816-26.

Bensinger SJ, Bandeira A, Jordan MS, Caton AJ, Laufer TM. Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells. **J Exp Med** 2001; **194**(4):427-38.

Böyum AJ. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. **Scand J Clin Lab Invest** 1968; **21**:77-89.

Castedo M, Hirsch T, Susin SA, Zamzami N, Marchetti P, Macho A, Kroemer G. Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis. **J Immunol** 1996; **157**:512–521.

Charcot JM. Histologie de la sclerose en plaques. **Gazette Hospital** 1868; **41**: 554-566

Cirone M, Cuomo L, Zompetta C, Ruggieri S, Frati L, Faggioni A, Ragona G. Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis: a study of T cell cross-reactivity to viral and myelin basic protein antigens. **J Med Virol** 2002 Oct; **68**(2):268-72.

Compston A. The genetics of multiple sclerosis. **J Neurovirol** 2000; **6 Suppl 2**:S5-9.

Compton MM. A biochemical hallmark of apoptosis: Internucleosomal degradation of the genome. **Cancer Metast Rev** 1992; **11**:105-119.

Confavreux C, Vukusic S. Age at disability milestones in multiple sclerosis. **Brain** 2006; **129**(Pt 3):595-605.

Crawford MP, Yan SX, Ortega SB, Mehta RS, Hewitt RE, Price DA, Stastny P, Douek DC, Koup RA, Racke MK, Karandikar NJ. High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8⁺ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. **Blood** 2004; **103**(11):4222-31.

Cross AH, Trotter JL, Lyons J. B cells and antibodies in CNS demyelinating disease. **J Neuroimmunol** 2001; **112**(1-2):1-14.

Cyster JG, Hartley SB, Goodnow CC. Competition for follicular niches excludes self-reactive cells from the recirculating B-cell repertoire. **Nature** 1994; 371(6496):389-95.

Darzynkiewicz Z, Traganos F. Measurement of apoptosis. **Adv Biochem Eng Biotechnol** 1998; 62:33-73.

Deng C, Radu C, Diab A, Tsen MF, Hussain R, Cowdery JS, Racke MK, Thomas JA. IL-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1) regulates susceptibility to organ-specific autoimmunity **J Immunol** 2003; 170(6):2833-42.

Diaz D, Prieto A, Barcenilla H, Monserrat J, Sánchez MA, Reyes E, Hernandez-Fuentes MP, de la Hera A, Orfao A, Alvarez-Mon M. Accurate apoptosis measurement requires quantification of loss of expression of surface antigens and cell fragmentation. **Cytometry A**. 2006; 69(4):240-8.

Dyment DA, Cader MZ, Willer CJ, Risch N, Sadovnick AD, Ebers GC. A multigenerational family with multiple sclerosis. **Brain** 2002; 125(Pt 7):1474-82.

Ebers GC, Bulman DE, Sadovnick AD, Paty DW, Warren S, Hader W, Murray TJ, Seland TP, Duquette P, Grey T, et al. A population-based study of multiple sclerosis in twins. **N Engl J Med** 1986; 315(26):1638-42.

Ekert PG, Silke J, Vaux DL. Caspase inhibitors. **Cell Death Differ** 1999; 6:1081-1086.

Endersen PC, Prytz PS, Aarbakke J. A new flow cytometric method for discrimination of apoptotic cells and detection of their cell cycle specificity through staining of F-actin and DNA. **Cytometry** 1995; 20:162-171.

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DI, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **J Immunol** 1992; 148:2207-2216.

Ferreira MAR, Mangino M, Brumme CJ, Zhao ZZ, Medland SE, Wright MJ, and others. Quantitative trait loci for CD4:CD8 lymphocyte ratio are associated with risk of type 1 diabetes and HIV-1 immune control. **Am J Hum Genet** 2010;86:88-92.

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. **J Exp Med** 2000; 192(7):1027-34.

Geurts JJ, Bö L, Pouwels PJ, Castelijns JA, Polman CH, Barkhof F. Cortical lesions in multiple sclerosis: combined postmortem MR imaging and histopathology. **AJNR Am J Neuroradiol**. 2005; 26(3):572-7.

Gniadek P, Aktas O, Wandinger KP, Bellmann-Strobl J, Wengert O, Weber A, von Wussow P, Obert HJ, Zipp F. Systemic IFN-beta treatment induces apoptosis of peripheral immune cells in MS patients. **J Neuroimmunol** 2003; **137**(1-2):187-96.

Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. **Anal Biochem** 1994; **218**:314-319.

Graninger WB, Steiner CW, Graninger MT, Aringer M, Smolen JS. Cytokine regulation of apoptosis and Bcl-2 expression in lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus. **Cell Death Differ** 2000; **7**(10):966-72.

Gregory SG, Schmidt S, Seth P, Oksenberg JR, Hart J, Prokop A, Caillier SJ, Ban M, Goris A, Barcellos LF, Lincoln R, McCauley JL, Sawcer SJ, Compston DA, Dubois B, Hauser SL, Garcia-Blanco MA, Pericak-Vance MA, Haines JL; Multiple Sclerosis Genetics Group. Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. **Nat Genet** 2007; **39**(9):1083-91.

Gröndal G, Traustadottir KH, Kristjansdottir H, Lundberg I, Klareskog L, Erlenndsson K, Steinsson K. Increased T-lymphocyte apoptosis/necrosis and IL-10 producing cells in patients and their spouses in Icelandic systemic lupus erythematosus multicase families. **Lupus** 2002; **11**(7):435-42.

Gross A et al. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. **J Biol Chem** 1999; **274**:1156-1163.

Grzegorzczak J, Kowalski ML, Pilat A, Iwaszkiewicz J: Increased apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with perennial allergic asthma/rhinitis: Relation to cell markers of apoptosis. **Mediators Inflamm** 2002; **11**:225-233.

Hader WJ, Elliot M, Ebers GC. Epidemiology of multiple sclerosis in London and Middlesex County, Ontario, Canada. **Neurology** 1988; **38**(4):617-21.

Hall MA, Ahmadi KR, Norman P, Snieder H, MacGregor AJ, Vaughan RW, Spector TD, Lanchbury JS. Genetic influence on peripheral blood T lymphocyte levels. **Genes Immun** 2000; **1**(7):423-7.

Hallal-Longo DE, Mirandola SR, Oliveira EC, Farias AS, Pereira FG, Metze IL, Brandão CO, Ruocco HH, Damasceno BP, Santos LM. Diminished myelin-specific T cell activation associated with increase in CTLA4 and Fas molecules in multiple sclerosis patients treated with IFN-beta. **J Interferon Cytokine Res** 2007; **27**(10):865-73

Haring JS, Pewe LL, Perlman S: Bystander CD8 T cell-mediated demyelination after viral infection of the central nervous system. **J Immunol** 2002; **169**:1550-1555.

Hartley SB, Cooke MP, Fulcher DA, Harris AW, Cory S, Basten A, Goodnow CC. Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. **Cell** 1993; 72(3):325-35.

Hauser SL, Bhan AK, Gilles F, Kemp M, Kerr C, Weiner HL. Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. **Ann Neurol** 1986; 19:578-87.

Hebb AL, Moore CS, Bhan V, Campbell T, Fisk JD, Robertson HA, Thorne M, Lacasse E, Holcik M, Gillard J, Crocker SJ, Robertson GS. Expression of the inhibitor of apoptosis protein family in multiple sclerosis reveals a potential immunomodulatory role during autoimmune mediated demyelination. **Mult Scler** 2008; 14(5):577-94

Hedley DW, McCulloch EA: Generation of oxygen intermediates after treatment of blast of acute myeloblastic leukemia with cytosine arabinoside. Role of Bcl-2. **Leukemia** 1996; 10:1143-1149.

Henandez MP, Reyes E, Prieto A, Zea A, Villa L, Sanchez-Atrio A, Esquivel F, Alvarez-Mon M: Defective proliferative response of T lymphocytes from patients with inactive systemic lupus erythematosus. **J Rheumatol** 1999; 26:1518-1526.

Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Ohlén C, Goverman J. A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. **J Exp Med** 2001; 194(5):669-76.

Ilonen J, Surcel HM, Jagerroos H, Nurmi T, Reunanen M: T lymphocyte subsets defined by double immunofluorescence in multiple sclerosis. **Acta Neurol Scand** 1990; 81:128-130.

Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NM. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. **Clin Immunol Immunopathol** 1997; 84(3):223-43.

Jaleco S, Swainson L, Dardalhon V, Burjanadze M, Kinet S, Taylor N: Homeostasis of naive and memory CD4+ T cells: IL-2 and IL-7 differentially regulate the balance between proliferation and Fas-mediated apoptosis. **J Immunol** 2003; 171:61-68.

Jankovic M, Casellas R, Yannoutsos N, Wardemann H, Nussenzweig MC. RAGs and regulation of autoantibodies. **Annu Rev Immunol.** 2004; 22:485-501.

Jin Z, El-Deiry WS. Distinct signaling pathways in TRAIL- versus tumor necrosis factor-induced apoptosis. **Mol Cell Biol.** 2006; 26(21):8136-48.

Johannisson A, Festin R: Phenotype transition of CD4+ T cells from CD45RA to CD45RO is accompanied by cell activation and proliferation. **Cytometry** 1995; 19:343-352.

Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Holenbeck AE, Lerman MA, Naji A, Caton AJ. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. **Nat Immunol** 2001; 2(4):301-6.

Kaser A, Deisenhammer F, Berger T, Tilg H. Interferon-beta 1b augments activation-induced T-cell death in multiple sclerosis patients. **Lancet** 1999; 353(9162):1413-4.

Kerfoot SM, Long EM, Hickey MJ, Andonegui G, Lapointe BM, Zanardo RC, Bonder C, James WG, Robbins SM, Kubes P. TLR4 contributes to disease-inducing mechanisms resulting in central nervous system autoimmune disease. **J Immunol** 2004; 173(11):7070-7.

Kerr JFR, Willie A, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer** 1972; 26:239-257.

Kivisäkk P, Mahad DJ, Callahan MK, Sikora K, Trebst C, Tucky B, Wujek J, Ravid R, Staugaitis SM, Lassmann H, Ransohoff RM. Expression of CCR7 in multiple sclerosis: implications for CNS immunity. **Ann Neurol** 2004; 55(5):627-38.

Koornstra JJ, Jalving M, Rijcken FE, Westra J, Zwart N, Hollema H, de Vries EG, Hofstra RW, Plukker JT, de Jong S, Kleibeuker JH. Expression of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand death receptors in sporadic and hereditary colorectal tumours: potential targets for apoptosis induction. **Eur J Cancer** 2005; 41(8):1195-202.

Kreuzfelder E, Shen G, Bittorf M, Scheiermann N, Thraenhart O, Seidel D, and others. Enumeration of T, B and natural killer peripheral blood cells of patients with multiple sclerosis and controls. **Eur Neurol** 1992; 32:190-4.

Kronenberg M, Rudensky A. Regulation of immunity by self-reactive T cells. **Nature** 2005; 435(7042):598-604.

Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. **J Exp Med** 1995; 182(2):459-65.

Laaksonen M, Pastinen T, Sjöroos M, Kuokkanen S, Ruutiainen J, Sumelahti ML, Reijonen H, Salonen R, Wikström J, Panelius M, Partanen J, Tienari PJ, Ilonen J. HLA class II associated risk and protection against multiple sclerosis-a Finnish family study. **J Neuroimmunol** 2002; 122(1-2):140-5.

Lafferty KJ, Cunningham AJ. A new analysis of allogeneic interactions. **Aust J Exp Biol Med Sci** 1975; 53(1):27-42.

Lane P, Haller C, McConnell F. Evidence that induction of tolerance in vivo involves active signaling via a B7 ligand-dependent mechanism: CTLA4-Ig protects V beta 8+ T cells from tolerance induction by the superantigen staphylococcal enterotoxin B. **Eur J Immunol**. 1996; 26(4):858-62.

Lang HL, Jacobsen H, Ikemizu S, Andersson C, Harlos K, Madsen L, Hjorth P, Sondergaard L, Svejgaard A, Wucherpfennig K, Stuart DI, Bell JI, Jones EY, Fugger L. A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. **Nat Immunol** 2002; 3(10):940-3.

Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Boussiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ. PD-L2 is a second ligand for PD-I and inhibits T cell activation. **Nat Immunol** 2001; 2(3):261-8.

Laufer TM, DeKoning J, Markowitz JS, Lo D, Glimcher LH. Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. **Nature** 1996; 383(6595):81-5.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell** 1997; 91:479-489.

Liston A, Lesage S, Wilson J, Peltonen L, Goodnow CC. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. **Nat Immunol**. 2003; 4(4):350-4.

Lizard G, Fournel S, Genestier L, Dgedin N, Chaput C, Flacher M, Mutin M, Panaye G, Revillard JP. Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. **Cytometry** 1995; 21:275-283.

Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. **Nat Med** 2002; 8(5):500-8.

Lovett-Racke AE, Trotter JL, Lauber J, Perrin PJ, June CH, Racke MK. Decreased dependence of myelin basic protein-reactive T cells on CD28-mediated costimulation in multiple sclerosis patients. A marker of activated/memory T cells. **J Clin Invest** 1998; 101(4):725-30.

Lowe CE, et al. Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. **Nat Genet** 2007; 39:1074-1082.

Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. **Neurology** 1996; 46(4):907-11.

Lundmark F, Duvefelt K, Iacobaeus E, Kockum I, Wallström E, Khademi M, Oturai A, Ryder LP, Saarela J, Harbo HF, Celius EG, Salter H, Olsson T, Hillert J. Variation

in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis. **Nat Genet** 2007; 39(9):1108-13.

Mabrouk I, Buart S, Hasmim M, Michiels C, Connault E, Opolon P, Chiocchia G, Lévi-Strauss M, Chouaib S, Karray S. Prevention of autoimmunity and control of recall response to exogenous antigen by Fas death receptor ligand expression on T cells. **Immunity** 2008; 29(6):922-33.

Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. **Annu Rev Immunol** 2003; 21:231-64.

Madakamutil LT, Maricic I, Sercarz E, Kumar V: Regulatory T cells control autoimmunity in vivo by inducing apoptotic depletion of activated pathogenic lymphocytes. **J Immunol** 2003; 170:2985–2992.

Magno G, Joris I. Apoptosis, oncosis y necrosis. An overview of cell death. **Am J Pathol** 1995; 146:3-16.

Marleau AM, Sarvetnick N. T cell homeostasis in tolerance and immunity. **J Leukoc Biol.** 2005; 78(3):575-84.

Marrack P, Kappler J, Mitchell T. Type I interferons keep activated T cells alive. **J Exp Med.** 1999; 189(3):521-30.

Mason D. A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. **Immunol Today** 1998; 19(9):395-404.

McConkey DJ. Calcium flux measurement in cell death. In: Cotter TG, Martin SJ. Techniques in apoptosis: a user's guide. **Portland press, London** 133, 1996.

Merelli E, Bedin R, Sola P, Barozzi P, Mancardi GL, Ficarra G, Franchini G. Human herpes virus 6 and human herpes virus 8 DNA sequences in brains of multiple sclerosis patients, normal adults and children. **J Neurol** 1997; 244(7):450-4.

Michałowska-Wender G, Wender M. Mononuclear subsets in the peripheral blood of multiple sclerosis patients in relation to results of brain gadolinium- enhancing imaging. **Folia Neuropathol** 2006; 44(1):67-71.

Monson NL, Brezinschek HP, Brezinschek RI, Mobley A, Vaughan GK, Frohman EM, Racke MK, Lipsky PE. Receptor revision and atypical mutational characteristics in clonally expanded B cells from the cerebrospinal fluid of recently diagnosed multiple sclerosis patients. **J Neuroimmunol** 2005; 158(1-2):170-81.

Muzio M. et al. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. **Cell** 1996; 85:817–827.

Nemazee D, Hogquist KA. Antigen receptor selection by editing or downregulation of V(D)J recombination. **Curr Opin Immunol** 2003; 15(2):182-9.

Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H: Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. **Trends Neurosci** 2002; 25:313–319.

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J Immunol Methods** 1991; 139:271-279.

Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. **N Engl J Med** 2000; 343(13):938-52.

Owens GP, Ritchie AM, Burgoon MP, Williamson RA, Corboy JR, Gilden DH. Single-cell repertoire analysis demonstrates that clonal expansion is a prominent feature of the B cell response in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. **J Immunol** 2003; 171(5):2725-33.

Palmer E. Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. **Nat Rev Immunol** 2003; 3(5):383-91.

Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, Orenstein JM, Kotler DP, Fauci AS: HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of the disease. **Nature** 1993; 362:355–358.

Pender MP. Genetically determined failure of activation-induced apoptosis of autoreactive T cells as a cause of multiple sclerosis. **Lancet** 1998;351(9107):978-81.

Pender MP. Infection of autoreactive B lymphocytes with EBV, causing chronic autoimmune diseases. **Trends Immunol** 2003; 24(11):584-8.

Pender MP. The essential role of Epstein-Barr virus in the pathogenesis of multiple sclerosis. **Neuroscientist** 2011; 17(4):351-67.

Perez VL, Van Parijs L, Biuckians A, Zheng XX, Strom TB, Abbas AK. Perez VL, Van Parijs L, Biuckians A, Zheng XX, Strom TB, Abbas AK. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. **Immunity** 1997;6(4):411-7.

Perniok A, Wedekind F, Herrmann M, Specker C, Schneider M. High levels of circulating early apoptic peripheral blood mononuclear cells in systemic lupus erythematosus. **Lupus** 1998;7(2):113-8.

Pettinelli CB, McFarlin DE. Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. **J Immunol** 1981; 127(4):1420-3.

Piacentini M, Fesus I, Farrace MC, Ghilbelli L, Piredda I, Meline G. The expression of “tissue” transglutaminase in two human cancer cell lines is related to the programmed cell death (apoptosis). **Eur J Cell Biol** 1995; **54**:246-254.

Picca CC, Caton AJ. The role of self-peptides in the development of CD4+ CD25+ regulatory T cells. **Curr Opin Immunol** 2005; **17**(2):131-6.

Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, Johnson KP, Sibley WA, Silberberg DH, Tourtellotte WW. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. **Ann Neurol** 1983;**13**(3):227-31.

Pozarowski P, Huang X, Halicka DH, Lee B, Johnson G, Darzynkiewicz Z: Interactions of fluorochrome-labeled caspase inhibitors with apoptotic cells: A caution in data interpretation. **Cytometry A** 2003; **55**(1):50-60.

Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. **Science** 2003; **301**(5638):1374-7.

Prieto A, Díaz D, Barcenilla H, García-Suárez J, Reyes E, Monserrat J, San Antonio E, Melero D, de la Hera A, Orfao A, Alvarez-Mon M. Apoptotic rate: a new indicator for the quantification of the incidence of apoptosis in cell cultures. **Cytometry** 2002; **48**(4):185-93.

Prieto A, Reyes E, Díaz D, et al. A new method for the simultaneous analysis of growth and death of immunophenotypically defined cells in culture. **Cytometry** 2000; **39**:56-66.

Qin Y, Duquette P, Zhang Y, Talbot P, Poole R, Antel J. Clonal expansion and somatic hypermutation of V(H) genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. **J Clin Invest** 1998; **102**(5):1045-50.

Raine CS. The Dale E. McFarlin Memorial Lecture: the immunology of the multiple sclerosis lesion. **Ann Neurol** 1994; **36** Suppl:S61-72.

Ravetch JV, Lanier LL. Immune inhibitory receptors. **Science**. 2000; **290**(5489):84-9.

Reinherz EL, Weiner HL, Hauser SL, Cohen JA, Distaso JA, Schlossman SF. Loss of suppressor T cells in active multiple sclerosis: analysis with monoclonal antibodies. **N Engl J Med** 1980; **303**:125–9.

Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Annu Rev Immunol** 2004; **22**:531-62.

Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D, Magliozzi R, Reynolds R, Cinque P, Andreoni L, Trivedi P, Salvetti M, Faggioni A, Aloisi F. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. **J Exp Med** 2007; **204**(12):2899-912.

Sharief MK, Douglas M, Noori M, Semra YK: The expression of pro- and anti-apoptosis Bcl-2 family proteins in lymphocytes from patients with multiple sclerosis. **J Neuroimmunol** 2002; **125**:155–162.

Sharief MK, Matthews H, Noori MA. Expression ratios of the Bcl-2 family proteins and disease activity in multiple sclerosis. **J Neuroimmunol** 2003; **134**(1-2):158-65.

Sharief MK, Noori MA, Zoukos Y. Reduced expression of the inhibitor of apoptosis proteins in T cells from patients with multiple sclerosis following interferon-beta therapy. **J Neuroimmunol** 2002; **129**(1-2):224-31.

Sharief MK, NooriMA, Douglas MR, Semra YK: Upregulated survivin expression in activated T lymphocytes correlates with disease activity in multiple sclerosis. **Eur J Neurol** 2002; **9**:503–510.

Sharief MK, Semra YK, Seidi OA, Zoukos Y. Interferon-beta therapy downregulates the anti-apoptosis protein FLIP in T cells from patients with multiple sclerosis. **J Neuroimmunol** 2001;**120**(1-2):199-207.

Sharief MK. Impaired Fas-independent apoptosis of T lymphocytes in patients with multiple sclerosis. **J Neuroimmunol** 2000;**109**(2):236-43.

Silvestris F, Grinello D, Tucci M, Cafforio P, Dammacco F. Enhancement of T cell apoptosis correlates with increased serum levels of soluble Fas (CD95/Apo-1) in active lupus. **Lupus** 2003; **12**(1):8-14.

Smith C, Scheinberg L. Clinical features of multiple sclerosis. **Sem Neurol** 1995; **85-93**.

Smolewski P, Bedner E, Du L, Hsieh TC, Wu JM, Phelps DJ, Darzynkiewicz Z. Detection of caspase activation by fluorochrome-labeled inhibitors: multiparameter analysis by laser scanning cytometry. **Cytometry** 2001; **44**:73-83.

Soldan SS, Berti R, Salem N, Secchiero P, Flamand L, Calabresi PA, Brennan MB, Maloni HW, McFarland HF, Lin HC, Patnaik M, Jacobson S. Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. **Nat Med** 1997; **3**(12):1394-7.

Thien M, Phan TG, Gardam S, Amesbury M, Basten A, Mackay F, Brink R. Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. **Immunity** 2004; **20**(6):785-98.

Thierry F, Demeret C. Direct activation of caspase 8 by the proapoptotic E2 protein of HPV18 independent of adaptor proteins. **Cell Death Differ** 2008; **15**(9):1356-63.

Thome M, Tschopp J: Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. **Nat Rev Immunol** 2001; **1**:50–58.

Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. **Immunity** 2003; 19(5):641-4.

Van Noort JM, Bajramovic JJ, Plomp AC, van Stipdonk MJ. Mistaken self, a novel model that links microbial infections with myelin-directed autoimmunity in multiple sclerosis. **J Neuroimmunol** 2000; 105(1):46-57.

Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. **J Exp Med** 2004; 199(7):971-9.

Villar LM, Masjuan J, González-Porqué P, Plaza J, Sádaba MC, Roldán E, Bootello A, Alvarez-Cermeño JC. Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. **Ann Neurol** 2003; 53(2):222-6.

Villar LM, Sádaba MC, Roldán E, Masjuan J, González-Porqué P, Villarrubia N, Espiño M, García-Trujillo JA, Bootello A, Alvarez-Cermeño JC. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. **J Clin Invest** 2005; 115(1):187-94.

Waldner H, Collins M, Kuchroo VK. Activation of antigen-presenting cells by microbial products breaks self tolerance and induces autoimmune disease. **J Clin Invest.** 2004; 113(7):990-7.

Walker LS, Abbas AK. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. **Nat Rev Immunol** 2002; 2(1):11-9.

Walunas TL, Bakker CY, Bluestone JA. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. **J Exp Med** 1996; 183(6):2541-50.

Walunas TL, Bluestone JA. CTLA-4 regulates tolerance induction and T cell differentiation in vivo. *J Immunol.* 1998 Apr 15; 160(8):3855-60. Lechner O, Lauber J, Franzke A, Sarukhan A, von Boehmer H, Buer J. Fingerprints of anergic T cells. **Curr Bio** 2001; 11: 587-595.

Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. **Science** 2003; 301(5638):1374-7.

Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, Basham B, Smith K, Chen T, Morel F, Lecron JC, Kastelein RA, Cua DJ, McClanahan TK, Bowman EP, de Waal Malefyt R. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. **Nat Immunol.** 2007; 8(9):950-7.

Wyllie AH, Arends MJ, Morris RG, Walker SW, Evan G. The apoptosis endonuclease and its regulation. **Seminars immunol** 1992; 4:389-398.

Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: An overview. **Cancer Metast Rev** 1992; 11:95-113.

Yin XM et al. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. **Nature** 1999; 400:886–891.

Zang YC, Li S, Rivera VM, Hong J, Robinson RR, Breitbach WT, Killian J, Zhang JZ. Increased CD8+ cytotoxic T cell responses to myelin basic protein in multiple sclerosis. **J Immunol** 2004; 172(8):5120-7.

Zerrahn J, Held W, Raulet DH. The MHC reactivity of the T cell repertoire prior to positive and negative selection. **Cell** 1997; 88(5):627-36.

Zhang GX, Gran B, Yu S, Li J, Siglienti I, Chen X, Kamoun M, Rostami A. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor-beta 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system. **J Immunol** 2003; 170(4):2153-60.

ANEXOS

Increased Spontaneous *Ex Vivo* Apoptosis and Subset Alterations in Peripheral Blood T Cells from Patients with Multiple Sclerosis

ALFREDO PRIETO,^{1,7} DAVID DÍAZ,^{1,7} HUGO BARCENILLA,¹ CARMEN CASTRILLO,² JORGE MONSERRAT,¹ ANTONIO GARCÍA MERINO,³ MELCHOR ÁLVAREZ-MON,^{1,4,5,6} for the GENIO II-group⁸

Received April 7, 2005; accepted November 4, 2005
Published online: 2 May 2006

In order to characterize the immunophenotype and the lymphocyte apoptosis in multiple sclerosis (MS) patients, the peripheral blood lymphocytes of 46 MS patients and 12 healthy volunteers were studied by flow cytometry. Immunophenotypic alterations included significant increases in T CD4 + lymphocytes and reductions in the percentages of CD3 + and CD8 + T cells. After 24 h of culture spontaneous apoptosis was increased in almost T lymphocyte subsets from MS patients and it was significantly higher in those patients who had suffered more than two relapses in the two previous years. The incidence of spontaneous apoptosis was not dependent on FasL-Fas interactions and correlated with the percentages of cells positive for active caspases but not with percentages of Fas + cells. The increased susceptibility to apoptosis of peripheral blood T lymphocytes from MS

patients is difficult to reconcile with the previously proposed role of a defective lymphocyte apoptosis in the pathophysiology of MS.

KEY WORDS: Multiple sclerosis; apoptosis; T lymphocyte; CD.

INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS), the commonest chronic demyelinating disease of the central nervous system (CNS), is believed to be an autoimmune condition, although its etiology remains unknown (1–3). Several findings demonstrate that T cells are involved in the pathogenesis of the disease (4–6). Abnormal immune responses with dysregulation of different components of the immune system (mainly abnormal activation of T cells and accessory cells) are pivotal in MS pathogenesis (7).

MS patients show changes in their peripheral blood lymphocytes (PBL), including hyperproliferative responses to polyclonal stimulation (7, 8) and the expansion of activated auto-reactive interleukin-2-responsive T cells against several myelin antigens (9). The prior activation of auto-reactive T lymphocytes in the peripheral lymphoid organs seems to be required for them to cross the blood-brain barrier (BBB) and initiate a local immune response in the nervous system (10). The presence of inadequately activated T lymphocytes in peripheral blood has been repeatedly reported in MS patients (11–13). This appears to be related to marked functional abnormalities in this lymphocyte compartment, which in turn seems to vary over the different stages of clinical activity (9, 12). Activated T cells express more Fas than resting T cells, and increased Fas expression has been described in MS patients (14). However, some studies report normal Fas expression and adequate responses to apoptogenic stimuli induced by CD95 ligation (15).

¹Laboratorio de Inmunología Clínica, Unidad Asociada I+D Consejo Superior Investigaciones Científicas (Centro Nacional de Biotecnología), Departamento de Medicina, Universidad de Alcalá, Madrid.

²Schering España, S.A.

³Servicio de Neurología, Hospital Puerta de Hierro, Madrid, Spain.

⁴Servicio de Enfermedades del Sistema Inmune y Oncología, Hospital Universitario "Príncipe de Asturias," Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

⁵Servicio de Medicina, Enfermedades del Sistema Inmune, Hospital Universitario "Príncipe de Asturias," 28805 Alcalá de Henares, (Madrid), Spain.

⁶To whom correspondence should be addressed at Departamento de Medicina, Universidad de Alcalá, Carretera Madrid-Barcelona, Km 33,600, 28871 Alcalá de Henares (Madrid) Spain.

⁷Alfredo Prieto and David Díaz contributed equally to this work and are joint first authors.

⁸The GENIO-II Group is composed by Pablo Barreiro from Hospital La Paz, Madrid; Clara de Andrés and M^a Luisa Martínez from Hospital Gregorio Marañón, Madrid; Bonaventura Casanova from Hospital La Fe, Valencia; Juan Antonio García-Merino and Rosario Blanco from Hospital Puerta de Hierro, Madrid; Jesús Martín from Hospital Miguel Servet, Zaragoza; Francisco Coret from Hospital Clínico, Valencia; José Carlos Álvarez-Cermeño and Dr José Francisco Plaza from Hospital Ramón y Cajal, Madrid; Eugenia Vilar, Blanca Felgueroso and Julián Benito from Hospital de Móstoles; Asunción Morales Otal and M^a Cruz Gutiérrez del Olmo from Hospital 12 de Octubre, Madrid.

Apoptosis of auto-reactive T cells is an important mechanism that downregulates autoimmune processes. *In vitro*, stimulated T lymphocytes from MS patients show increased expression of antiapoptotic genes (16–19). However, to equate overexpression of these genes with resistance to apoptosis might be unwise. The expression of these genes does not necessarily correlate with true susceptibility to apoptosis, as determined experimentally and not simply inferred from gene expression data (20). For example, naïve T cells are more resistant to apoptosis than activated T cells, despite the fact that they show downregulation of several antiapoptotic genes that are upregulated in activated T cells (21).

The studies of apoptosis in MS have been focused on the apoptosis of *in vitro* activated autoreactive T cells after *in vitro* expansion. It has been shown that myelin autoreactive T cells from MS patients are more resistant to activation-induced cell death than those obtained from healthy individuals (22). These findings may have different interpretations including that the cell progeny of autoreactive memory T cells in MS patients is more resistant to apoptosis than the progeny of naïve T cells expanded in healthy individuals. Furthermore, autoreactive T cells against a determined autoantigen such as myelin basic protein are a minor subset of the memory subset and thus the properties of the minority subset of autoreactive T cells are not necessarily representative of the whole T cell compartment.

No study has compared the incidence of apoptosis in fresh PBLs from MS patients and healthy controls. An article was published on the incidence of apoptosis in frozen/thawed PBLs from MS patients under IFN β treatment, but it provided no comparative analyses with healthy controls (23). The present work extensively investigates both the phenotypic composition and susceptibility of fresh PBLs to apoptosis, and specifically analyses the main T and B lymphocyte subsets from a population of untreated MS patients. A group of healthy age- and sex-matched individuals was included as a control population.

PATIENTS AND METHODS

Patients

This investigation was designed as an open, single-blinded, observational, multi-center study (performed in Spain). The study subjects were interferon-naïve relapsing-remitting (RR) and secondary progressive (SP) MS patients and healthy controls. Patients were enrolled at 10 tertiary care hospitals by certified neurologists with expertise in MS. The study was approved by the institutional

review boards and all patients gave informed consent to participate.

Forty eight patients fulfilled the inclusion criteria of: (a) clinical MS according to Poser's criteria; (b) EDSS range <5.5; (c) clinically active disease (defined in RR patients by at least two attacks in the preceding 2 years); and (d) having undergone a wash-out period after the last attack of at least 30 days. The exclusion criteria included any major systemic medical disorder, the use of any kind of immunomodulator or immunosuppressive drug prior to the study, including the use of steroids in the previous 3 months.

Forty-six patients (16 males and 30 females [35%/65%]) were included in the study and were eligible for baseline analysis. The mean age was 36.9 ± 11.2 years, mean EDSS score was 3.2 ± 1.77 , and mean age at onset was 28.5 ± 7.6 years. The mean number of relapses within the 2 years prior to the study was of 1.9 ± 1.2 .

Routine blood tests were performed for blood cell count, AST, ALT, creatinine, bilirubin, TSH, T4 and pregnancy if applicable. Magnetic Resonance imaging was not specifically performed in this study. Blood samples were collected by an attending physician (unblinded) and sent for analysis (blinded) to a central laboratory (Laboratory of Immunology and Oncology, Department of Medicine, University of Alcalá). To determine immunophenotypes and prevalence of apoptosis, 30 mL of heparinized blood were refrigerated 4°C, purified, and cultured within 4 h of collection.

Cell Separation

Peripheral blood mononuclear cells from MS patients and healthy controls were obtained by Ficoll-Hypaque (Lymphoprep Nyegaard and Co., Oslo, Norway) gradient centrifugation as previously described (24). Purified PBMC were resuspended in RPMI 1640 (Whitaker Bioproducts, Verviers, Belgium) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 25 mM Hepes (Biochrom KG) and 1% penicillin-streptomycin (Whitaker Bioproducts). Initial cell enumeration was performed by conventional light microscopy using trypan blue exclusion in a Neubauer chamber, and by flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson, San José CA) according to previously reported methods (25). Cell viability of fresh PBMC was checked by both trypan blue (light microscopy) and 7-AAD (flow cytometry) exclusion (26), and was always greater than 95%. After determining the cell concentration by microscopy, cells were adjusted to 1×10^6 cells/mL and cultured at a cell density of 250,000 cells/mL.

Immunophenotype Studies

For immunofluorescent staining, fresh lymphocytes were incubated with combinations of fluorescein (FITC, green), phycoerythrin (PE, orange), and peridinin chlorophyll protein conjugate (PerCP, red)-labeled monoclonal antibodies (MoAbs). The MoAbs were used in three-color combinations (FITC/PE/PerCP): CD3/CD8/CD4, CD3⁻/CD8⁻; CD19⁻/CD3⁻, CD45RA/CD45RO/CD4, CD45RA/CD45RO/CD8 and CD95/CD8/CD3. Control studies with unstained cells and cells incubated with isotype-matched irrelevant FITC-, PE- and PerCP-labeled MoAbs were performed for each experiment. Anti-CD3-FITC, anti-CD4-PerCP, anti-CD8-PerCP, anti-CD19-FITC, anti-CD3-PerCP and anti-CD95-FITC MoAbs were obtained from Becton & Dickinson (Mountain View, CA, USA). Anti-CD8-PE, anti-CD5-PE, anti-CD45RA-FITC and anti-CD45RO-PE MoAbs were obtained from Caltag (San Francisco, CA). Cell acquisition and three-color immunofluorescence analysis were performed with a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) using CellQuest II software (Becton Dickinson). In the FSC-SSC dot plot, a biparametric gate was drawn around the CD45⁺ CD14⁻ population.

Cell Cultures for Measurement of Spontaneous Ex Vivo Apoptosis and Mitogen-Induced Apoptosis

Lymphocytes (50,000 cells/well) were cultured in duplicate in complete medium in 96 flat-bottom culture plates for 24 h. Spontaneous apoptosis was studied by culture without apoptosis-inducing compounds in T cell subsets and B lymphocytes from MS patients and healthy controls. Mitogen induced apoptosis was studied by culture in the presence of Phytohemagglutinin (PHA, 2 µg/mL, Difco Lab, Detroit, MI, USA) as previously described (25). Cultures were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Quantification of Apoptotic Cells

The prevalence of apoptosis within the different subsets was determined after culture for 24 h. Three different methods were used to determine the prevalence (percentage) of apoptotic cells. One method identified apoptotic cells of phenotypically defined subsets by the expression of phosphatidylserine on the outer side of the plasma membrane (27). A second method identified apoptotic cells by their hypodiploid DNA content measured after the extraction of fragmented low molecular weight (LMW) DNA (28). The third method identified apoptotic cells by the detection of active forms of caspases. Spontaneous

and PHA-stimulated lymphocyte apoptosis were both determined.

Determination of Annexin-V Positive Apoptotic Cells

The percentages of apoptotic T-cells expressing CD3, CD4, CD8 and CD45RO/RA antigens, and of B-cells expressing CD19 antigens, were calculated. For combinations of immunofluorescence staining and annexin-V-FITC (Bender Medsystems, Vienna, Austria) labeling, we used a previously described but optimized method (29). Briefly, either fresh or cultured cells were incubated with three-color combinations of MoAbs. After antibody incubation for 20 min at 4°C, the cells were diluted in fresh complete medium to optimize the subsequent cell wash. The wash involved 5 min of centrifugation (300 × g) at 4°C followed by cell resuspension in Ca²⁺-binding buffer (Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1.8 mM, and KCl 5 mM (Sigma Chemical Company St. Louis, MO)) adjusted to pH 7.4. The cells were then labeled with a solution of annexin V-FITC diluted in Ca²⁺-binding buffer for 10 min to identify early apoptotic cells.

Combinations of annexin-V and three-color MoAb staining were used to define apoptotic cells within lymphocyte subsets (PE/PerCP/APC): CD45RA/CD4/CD45RO, CD45RA/CD8/CD45RO, ⁻/CD8/CD3⁻/CD19. Control studies involving unstained cells and cells incubated with isotype-matched irrelevant, PE-, PerCP-, and APC-labeled monoclonal antibodies were performed with each experiment. Anti-CD4-PerCP, anti-CD45RO-APC, anti-CD8-PerCP, anti-CD3-APC, and anti-CD19-APC MoAbs were obtained from Becton & Dickinson. Anti-CD45RA-PE MoAb was obtained from Laboratories (Burlingame, California, USA). Cell acquisition and four-color fluorescence analysis were performed using a FACSCalibur flow cytometer (Becton & Dickinson) using CellQUEST software (Becton & Dickinson). A biparametric gate was drawn around the lymphocyte population in the FSC-SSC dot plot, using the information obtained in a 7AAD-FSC plot to discriminate between dead cells and cell debris (25).

Quantification of Apoptotic Nuclei by Hypodiploid DNA Content

This determination of apoptotic cells was based on the extraction of LMW DNA as described by Nicoletti *et al.* (28). Briefly, after 24 h of culture, PBMCs were treated with a citrate buffer containing 0.1% Triton X-100 (Sigma Chemical Company) to extract LMW DNA from the nuclei of apoptotic cells. The remaining DNA content was stained with propidium iodide (PI, Sigma Chemical Company). Cells with a hypodiploid DNA content

(apoptotic cells) were distinguished from cells with normal diploid DNA content (non-apoptotic cells) by measuring PI-associated fluorescence intensity in a flow cytometer.

Determination of Positive Cells for Active Forms of Caspases -3, -8, and 9

The third method of detection of apoptotic cells is based on the addition of a fluorochrome-labeled inhibitor of caspases (FLICA) that binds covalently to the active caspase (30). Caspase 3 (FAM-DEVD-FMK), caspase 8 (FAM-LETD-FMK) and caspase 9 (FAM-LEHD-FMK) detection kits were obtained from Immunochemistry Technologies, LLC (Bloomington, MN, USA). The FLICA were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Company) to obtain a $150 \times$ FLICA stock solution and were aliquoted and stored at -20°C in the dark. Cells were stained according to the manufacturer instructions. Briefly, prior to use, a $30 \times$ FLICA solution was prepared by diluting the stock solution 1:5 in phosphate-buffered saline (PBS). After the cell culture period, $30 \times$ FLICA solution was added to the cell suspensions at 1:30 volume ratio and cells were incubated for 1 h at 37°C under 5% CO_2 . After the incubation, cells were labeled with anti-CD3 antibodies, washed and acquired in a FACScalibur flow cytometer.

Assays of Blocking of Fas Dependent Death Pathway

In six MS patients, the antigen CD95 (Fas) was blocked with a non apoptogenic anti-CD95 antibody to avoid the Fas-induced apoptosis in the cultures. Lymphocytes were cultured as describe above. $1 \mu\text{g/mL}$ of a non apoptogenic anti-CD95 antibody (Bender Medsystems, clone SM1/23) was added to the cultures to block the CD95 antigen. Apoptosis was measured after 24 h of culture.

Calculation of Apoptotic Cell Percentages

The percentage of apoptotic cells was calculated by dividing the number of apoptotic cells in a lymphocyte population (annexin V + stained or hypodiploid cells) by the total number of those cells in the sample (apoptotic plus non-apoptotic cells). For the annexin method, cell subsets were defined by the expression of lineage antigens (27). The following formula was used for the calculation:

$$\% \text{Apo cells} = 100 \times (\text{Apo} / (\text{Apo} + \text{NonApo}))$$

where: Apo: represents the number of apoptotic cells (annexin V positive cells, hypodiploid cells or positive cells for active forms of caspases) and NonApo: represents the

number of non-apoptotic cells (annexin V negative cells, cells with diploid DNA or cells negative for active forms of caspases respectively).

To determine the level of cell death attributable to activation-induced cell death (AICD) in each cell subset we subtracted the percentage of spontaneous apoptosis to the percentage of mitogen-induced apoptosis.

Statistical Methods

Data were evaluated using SPSS 11.0 software. The descriptive analysis for qualitative variables included size, mean, median, standard deviation, standard error, and minimum and maximum values. Comparisons between MS patients and healthy controls were performed using the Wilcoxon unpaired test. Statistical significance was set at $p \leq 0.05$. Correlations were sought using the Spearman bivariate correlation test.

RESULTS

Abnormal T Cell Distribution in PBLs from MS Patients

Several alterations were seen in the distribution of T cells of MS patients (Fig. 1). Firstly, a significant reduction in the percentage of T cells ($\text{CD}3+$) ($p < 0.05$) was seen with respect to healthy controls. MS patients also showed a significant increase in the percentage of $\text{CD}4+$ T lymphocytes ($p < 0.05$) and a decrease in $\text{CD}8+$ T lymphocytes ($p < 0.05$) with respect to the total number of $\text{CD}3+$ T lymphocytes. However, these differences were not found for B cells, nor for the T cell subsets defined by the expression of CD45 isoforms within the CD4 and CD8 subpopulations ($\text{CD}4+\text{CD}45\text{RA}+$, $\text{CD}4+\text{CD}45\text{RO}+$, $\text{CD}8+\text{CD}45\text{RA}+$, and $\text{CD}4+\text{CD}45\text{RO}+$) (data not shown). For the studied subsets, there were no significant differences between RR and SP MS patients, nor between those with more than two relapses or two or fewer relapses in the 2 years prior to the study (data not shown).

Increased Susceptibility to Apoptosis in T Cells of MS Patients

To study the susceptibility to apoptosis of peripheral lymphocytes from MS patients we used three different quantitative multiparametric flow cytometry methods (28, 29). We detected translocated phosphatidylserine on apoptotic cells from different cell subsets defined by their expression of lineage antigens. We also detected hypodiploid nuclei from apoptotic cells of the whole cell preparations after low molecular weight DNA extraction. Flow

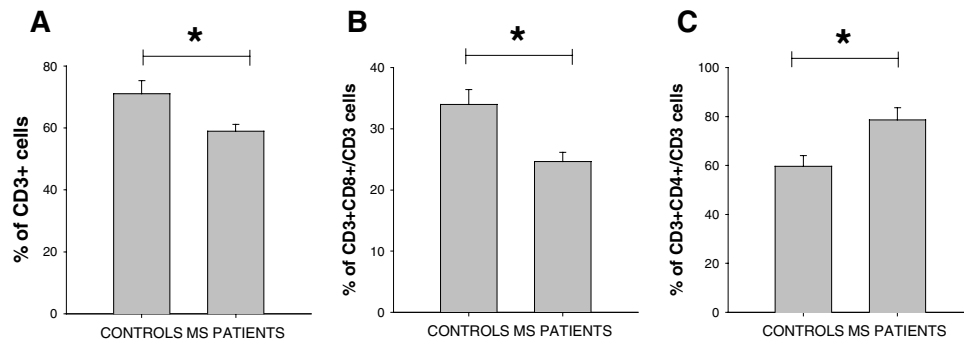


Fig. 1. Lymphocyte subset percentages in healthy controls and multiple sclerosis patients. (A–C) show the percentages of different lymphocyte subsets of 12 healthy control (CONTROLS) and 46 multiple sclerosis patients (MS PATIENTS). The percentage of CD3+ cells (with respect to total lymphocytes) is shown in panel (A), the percentage of CD3+CD8+ cells (with respect to CD3+ lymphocytes) is shown in panel (B) and the percentage of CD3+CD4+ cells (with respect to CD3+ lymphocytes) is shown in panel (C). Data are mean \pm SE of 12 healthy control and 46 multiple sclerosis patients. (*) indicates significant differences between healthy controls and multiple sclerosis patients.

cytometry raw data from representative cases of spontaneous apoptosis after 24 h of culture in MS patients and healthy controls are exemplified in Fig. 2. The percentages of apoptotic cells measured were markedly increased in the MS patient irrespectively of the method used and affected to all T cell subsets studied (CD4+CD45RA+ and CD4+CD45RO+ are shown).

Although fresh peripheral blood cells from MS patients (after purification) showed no significant alterations in percentage of apoptotic cells in any of the lymphocyte subsets studied (data not shown), a significant increase was seen in the percentage of apoptotic cells in unstimulated PBLs (spontaneous *ex vivo* apoptosis) after 24 h of culture ($p < 0.04$). This increase occurred selectively in T lymphocytes ($p < 0.03$)—it was not seen in B lymphocytes (Fig. 3). The increase in T lymphocyte spontaneous apoptosis was observed in both CD3+CD4+ ($p < 0.03$) and CD3+CD8+ ($p < 0.002$) subsets. Increased spontaneous apoptosis was also seen in the naive (CD45RA+) and memory (CD45RO+) cells of both CD4 and CD8 T lymphocyte subsets ($p < 0.008$ and $p < 0.002$ for naive and memory CD4+ T cells, $p < 0.004$ and $p < 0.005$ for naive and memory CD8+ T cells, respectively). The increase in T lymphocyte spontaneous apoptosis after 24 h of culture was so impressive that in more than half of MS patients and for all studied T cell subsets the percentages of apoptotic lymphocytes were over the maximum values of the correspondent normal ranges found in the group of healthy controls (data not shown).

When mitogen-induced apoptosis was measured a similar pattern of differences between MS and controls was found. There were no significant differences in the percentages of apoptotic B cells observed

in MS patients and healthy controls but significant increases in the percentages of apoptotic cells were also found in the mitogen-induced apoptosis of the CD3+ ($p < 0.05$), CD3+CD4+ ($p < 0.05$), CD4+CD45RA+ ($p < 0.03$), CD4+CD45RO+ ($p < 0.006$), CD8+CD45RA+ ($p < 0.02$) and CD8+CD45RO+ ($p < 0.009$) subsets (Data not shown). To determine the level of cell death caused by activation-induced cell death (AICD) we subtracted in each cell subset the percentage of spontaneous apoptosis to the percentage of mitogen-induced apoptosis. The results showed that in all studied T cell subsets from MS patients the percentages of cells that suffered AICD were not statistically different of the percentages of AICD observed in healthy individuals (data not shown).

Susceptibility to Spontaneous Apoptosis of T Lymphocytes is Significantly Correlated to the Prior Relapse Activity

When patients were divided into subgroups on the basis of clinical characteristics, those who had suffered more than two attacks in the prior 2 years showed significantly more spontaneous apoptosis than those who had suffered two or fewer relapses. This was observed for the whole population of peripheral blood lymphocytes ($p < 0.003$) and for the CD3+ ($p < 0.003$) CD3+CD4+ ($p < 0.005$), CD3+CD8+ ($p < 0.005$), CD4+CD45RA+ ($p < 0.002$), CD4+CD45RO+ ($p < 0.007$), CD8+CD45RA+ ($p < 0.001$) and CD8+CD45RO+ ($p < 0.003$) subsets (Fig. 3). However, no significant differences were found in the percentages of apoptotic B cells.

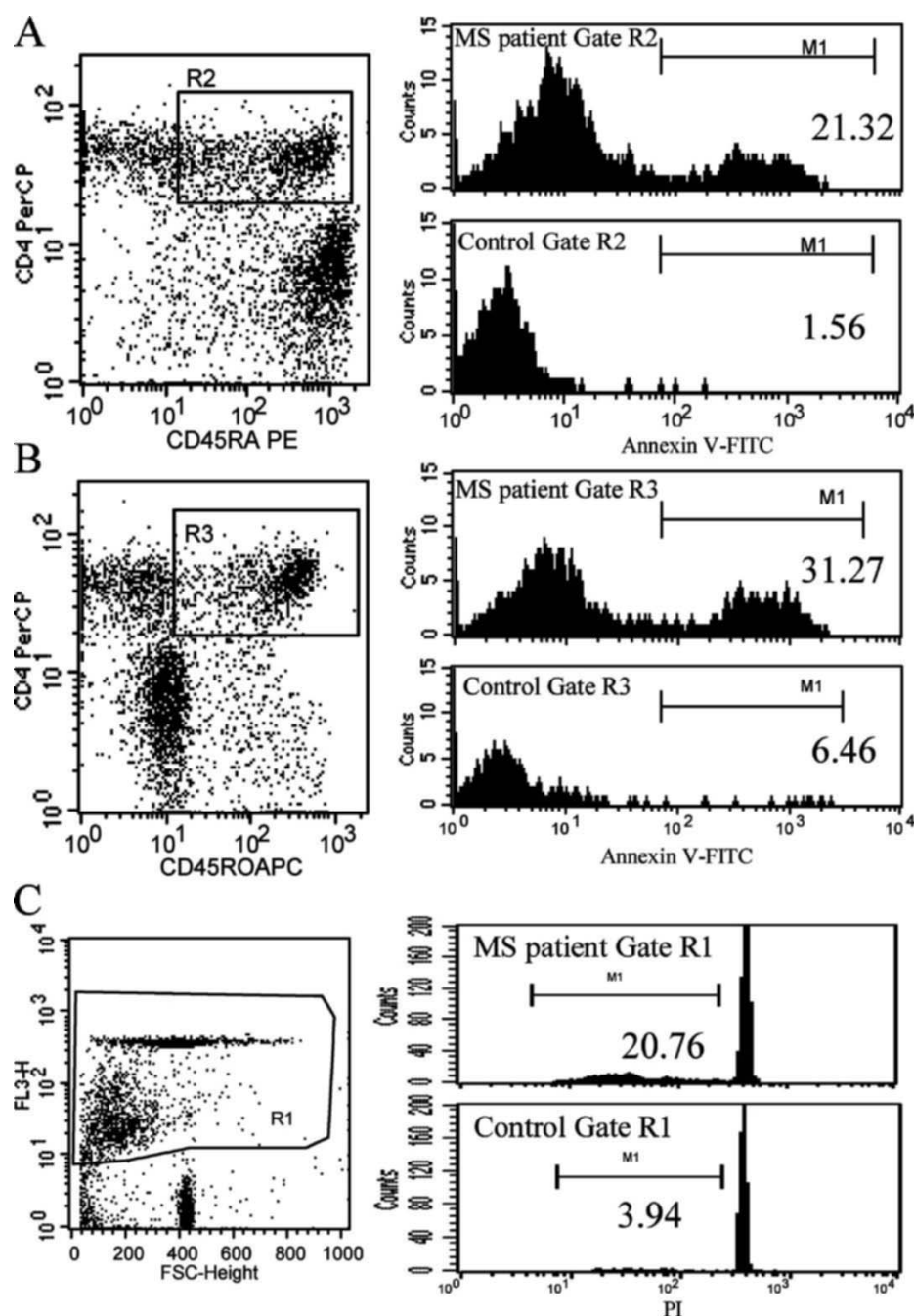


Fig. 2. Apoptosis as measured by annexin-V binding or low molecular weight DNA extraction is increased in peripheral lymphocytes from MS patients. We analyzed spontaneous apoptosis after 24 h of culture by annexin-V binding method within CD4 + CD45RA + cells (panel A, gate R2) and CD4 + CD45RO + cells (panel B gate R3). Each cell population was selected in a biparametric dot-plot (*left*) and apoptosis occurrence within the selected population was evaluated by the percentage of annexin-V-FITC positive cells. The two histograms of each panel show results from one characteristic MS patient (*upper histogram*) and one control (*lower histogram*). Spontaneous apoptosis was also evaluated by LMW DNA extraction method (panel C). Cells were selected in a biparametric Forward scatter vs. propidium iodide (PI) fluorescence dot-plot and apoptosis was evaluated by the percentage of hypodiploid cells in a PI fluorescence histogram of one characteristic MS patient (*upper PI histogram*) and one healthy control (*lower PI histogram*).

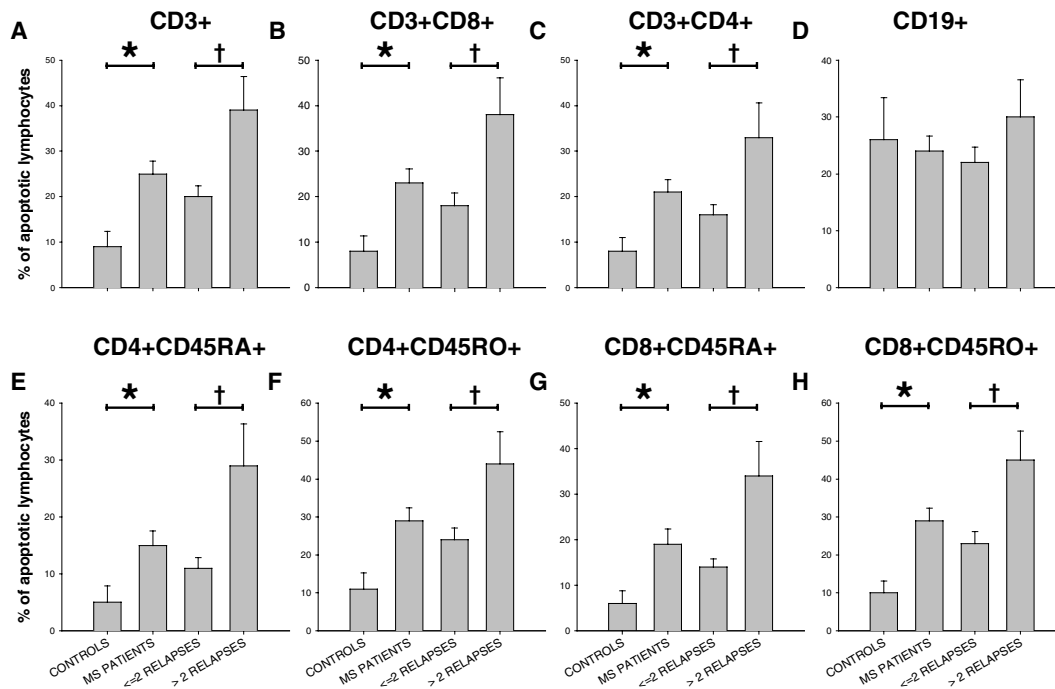


Fig. 3. Spontaneous apoptosis in lymphocyte subsets from healthy controls and multiple sclerosis patients. PBMCs were cultured for 24 h in complete medium and spontaneous apoptosis measured as a percentage of the phosphatidyl serine-positive apoptotic cells as determined by annexin V-FITC-binding. The different panels show the percentage of apoptotic lymphocytes of each subset from 12 healthy controls, 46 multiple sclerosis (MS) patients (MS PATIENTS), 35 MS patients who had suffered two or fewer attacks in the 2 years before the study (≤ 2 relapses), and 11 MS patients who had suffered more than two attacks in the same period (> 2 relapses). The percentage of apoptotic CD3 + lymphocytes is shown in panel (A), the percentage of apoptotic CD3 + CD8 + lymphocytes is shown in panel (B), the percentage of apoptotic CD3 + CD4 + lymphocytes is shown in panel (C), the percentage of apoptotic CD19 + lymphocytes is shown in panel (D), the percentage of apoptotic CD4 + CD45RA + lymphocytes is shown in panel (E), the percentage of apoptotic CD4 + CD45RO + lymphocytes is shown in panel (F), the percentage of apoptotic CD8 + CD45RA + lymphocytes is shown in panel (G), the percentage of apoptotic CD8 + CD45RO + lymphocytes is shown in panel (H). Data depict mean \pm SE. (*) indicates significant differences between healthy controls and MS patients. (†) indicates significant differences between MS patients with two or fewer attacks and MS patients with more than two attacks.

After 24 h of culture, significant and positive correlations were found between the percentages of apoptotic cells in several lymphocyte subsets (CD3 + CD4 +, CD4 + CD45RA +, CD4 + CD45RO +, CD + 8CD45RA +, CD8 + CD45RO +) and the number of attacks suffered in the previous 2 years (Table I). Interestingly, values of spontaneous and mitogen-induced apoptosis did not differ between RR and SP MS patients (data not shown).

We studied the relationship between the activation of CD4 and CD8 T lymphocyte subsets from MS patients and their spontaneous apoptosis. We analyzed in both cell subsets the correlations between the percentages of such cells expressing the low molecular weight isoform of CD45 antigen (a marker of previous activation) with the percentages of apoptotic cells. We found strong and positive correlations between the expression of CD45RO

in fresh cells and the percentage spontaneous apoptosis after 24 h of culture within both CD4 ($p < 0.001$ $r = 0.501$) and CD8 ($p < 0.02$ $r = 0.357$) subsets. Similar correlations were also found between basal expression of CD45RO and percentages of apoptotic cells after 24 h of PHA stimulation in both CD4 ($p < 0.001$ $r = 0.608$) and CD8 ($p < 0.05$ $r = 0.322$) subsets.

Increased Spontaneous Apoptosis in PBLs from MS Patients is Confirmed by Detection of Cells with Low Molecular Weight DNA

To confirm the increased prevalence of spontaneous apoptosis in MS patients apoptosis was also measured by an independent method based on DNA fragmentation that occurs in apoptotic cells. Despite the lower sensitivity of the Nicoletti method which rendered lower percentages

Table I. Correlations Between Prevalence of Apoptosis in Lymphocyte Subsets from MS Patients After 24 h of Culture and Relapse Rate in the Previous 2 years

Cell subset	Spontaneous apoptosis	Correlation coefficient (<i>r</i>)	PHA-induced apoptosis	Correlation coefficient (<i>r</i>)
	<i>p</i> value		<i>p</i> value	
CD3 + CD4 +	0.028 ^a	0.33	0.017 ^a	0.37
CD4 + CD45RA +	0.005 ^a	0.42	0.003 ^a	0.44
CD4 + CD45RO +	0.028 ^a	0.33	0.012 ^a	0.39
CD3 + CD8 +	0.080	0.26	0.157	0.22
CD8 + CD45RA +	0.035 ^a	0.32	0.014 ^a	0.38
CD8 + CD45RO +	0.001 ^a	0.47	0.050 ^a	0.31
CD19 +	0.300	0.16	0.773	0.05

Note. Correlation coefficients and *p* values were obtained using the Spearman bivariate correlation test.

^aIndicates a significant correlation between percentage of apoptotic cells and rate of attack in the previous 2 years.

of apoptotic cells than the annexin-V based method, the measurements of the proportion of hypodiploid cells confirmed those obtained by labeling the phosphatidylserine of apoptotic cells with annexin-V. In cultures performed to determine spontaneous apoptosis PBLs from MS patients showed significantly higher percentages of hypodiploid

apoptotic cells (Fig. 4). Additionally, in cultures performed to determine spontaneous apoptosis the PBLs of MS patients with more than two attacks showed greater mean percentages of hypodiploid cells, compared to patients who had suffered two or fewer attacks. However, these differences were not statistically significant (Fig. 4).

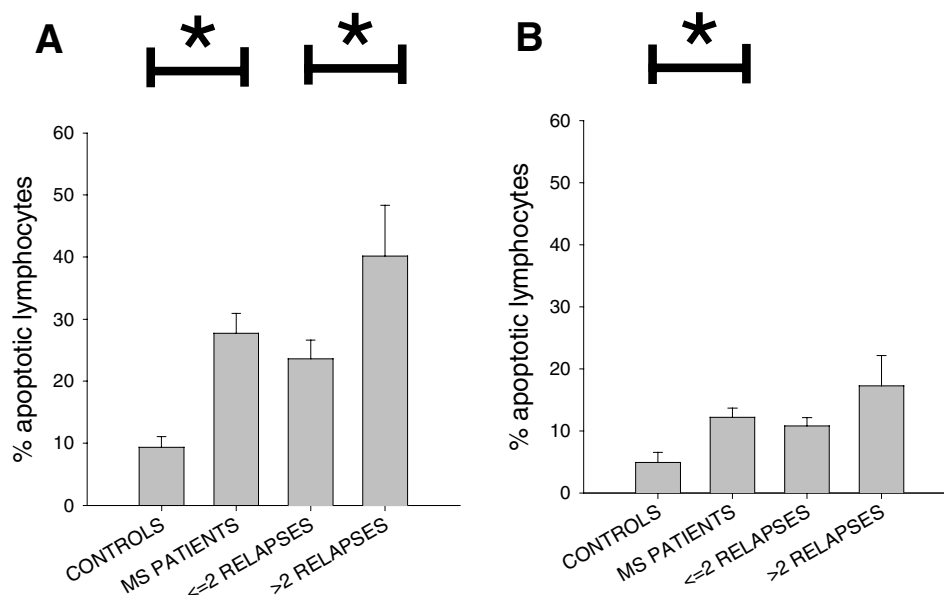


Fig. 4. Percentages of lymphocytes that undergo spontaneous apoptosis in healthy controls and multiple sclerosis patients. PBMCs were cultured for 24 h in complete medium without phytohemagglutinin ($2 \mu\text{g/mL}$). Spontaneous apoptotic cells were determined by two different methods: phosphatidylserine exposure on the outer membrane leaflet as determined by fluorescein labeled annexin V (A), and extraction of low molecular weight DNA from apoptotic nuclei (B). Panels (A) and (B), show the percentage of apoptotic lymphocytes for 12 healthy controls 46 multiple sclerosis patients (MS PATIENTS), 35 multiple sclerosis patients who had suffered two or fewer attacks in the 2 years prior to the study (≤ 2 relapses), and 11 MS patients who had suffered more than two attacks in the same period (>2 relapses). Data show mean \pm SE. (*) indicates significant differences $p < 0.05$.

Spontaneous Apoptosis of T Lymphocytes from MS Patients do not Correlate with the Expression of CD95 and is not Inhibited by Blocking Anti-CD95 (Fas) Antibodies

To determine whether the increase of spontaneous apoptosis of the lymphocytes of MS patients is due to an increment of Fas-induced apoptosis, we compared the percentage of CD95 expressing T cells of 6 healthy controls and 6 MS patients. Although the percentage of fresh T cells that express CD95 was significantly higher in MS patients there was not statistical correlation between the percentage of T cells that expressed CD95 and the percentage of cells that underwent spontaneous apoptosis after 24 h of culture ($p = 0.492$, $r = 0.352$). Furthermore, when antigen CD95 was blocked by the addition of saturant doses of non apoptogenic anti-CD95 antibodies (SM1/23) to the culture medium, the apoptosis of lymphocytes did not decrease with respect to the spontaneous apoptosis observed in cultures without these blocking antibodies (data not shown).

Activation of Caspases in T Lymphocytes from MS Patients

To confirm that the lymphocytes of MS patients were specifically undergoing a caspase dependent pathway of apoptosis we studied the activation of the caspases 3, 8, and 9 in six MS patients and six healthy controls. The percentages of T cells positive for the active forms of each one of these three caspases at 24 h of culture were significantly higher in the MS patients than in healthy controls ($p < 0.001$). We also studied in T cells from these MS patients the correlation between the percentage of annexin-V + cells and the percentages of positive cells for the active forms of the three caspases. There were strong statistical correlations at 24 h of culture between the percentage of annexin-V + cells and the caspase 3 ($p < 0.001$, $r = 0.999$), caspase 8 ($p < 0.001$, $r = 0.999$) and caspase 9 ($p < 0.002$, $r = 0.998$).

To determine the pathway of caspase activation in MS patients we studied the percentages of positive T cells for active forms of caspases at three hours of culture in three selected MS patients with recent relapses. We found that the percentages of positive T cells for active forms of caspases 3 and 8 were twofolds higher than the percentages of positive T cells for active form of caspase 9 (data not shown).

DISCUSSION

This work shows that T lymphocytes from untreated RR and SP MS patients have a marked increase in

susceptibility to spontaneous *ex vivo* apoptosis. Impressive increases in apoptosis were seen in several T-cell subpopulations, but not among B-cells. Compared to controls, the percentage of several populations of T cells that underwent spontaneous apoptosis in MS patients was between two and fourfolds higher. These determinations of apoptotic cells were performed in fresh T cells using three different and independent methods (annexin-V labeling, DNA content after LMW DNA extraction and caspase activation). Increased spontaneous apoptosis after *ex vivo* culture of T lymphocytes from MS patients is therefore clearly established by this work.

We have found at 24 h of cultures in T lymphocytes from MS patients significantly increased percentages of positive cells for caspases 3, 8, and 9. The significant increases in caspase activation found in MS patients and the strong and highly significant correlations found between the percentages of cells that have active caspases and the percentage of annexin-V + cells demonstrate that the increase in spontaneous apoptosis in fresh peripheral blood T cells from MS patients is mediated by the activation of caspases 3, 8, and 9.

Our kinetic experiments on caspase activation demonstrated that at three hours of culture there is significant expression of the extrinsic caspase 8. However, the lack of correlation between Fas expression and T cell apoptosis and the failure of blocking anti-Fas antibodies to prevent spontaneous apoptosis demonstrate that the increment of spontaneous apoptosis in MS patients is not dependent of Fas-FasL interactions in the culture. Therefore a caspase 8 mediated extrinsic pathway independent of Fas triggering appears to be involved in the increase of spontaneous apoptosis found in MS patients.

T lymphocyte apoptosis is thought to be a control mechanism in bringing about tolerance to autoantigens as well as in the downregulation and termination of responses to foreign antigens. The response of T lymphocytes to activation signals depends on an exquisite balance which determines survival of the cell or initiation of apoptotic processes (31). This dichotomy controls the expansion and retraction of antigen specific clones, and may have physiological and pathological implications (32). Inadequate activation of T lymphocytes usually leads to a state of susceptibility to programmed cell death (33). In several autoimmune, allergic and infectious diseases, increased *ex vivo* apoptosis of peripheral blood T lymphocytes has been demonstrated (34–37).

The ultimate cause of increased T lymphocyte apoptosis in inflammatory diseases remains uncertain and different mechanisms have been proposed (33–37). Conversely, the increased apoptosis observed in T lymphocytes in

inflammatory disease could be related to the intensity of inflammatory reactions in the lymphoid environment.

If this were the case in MS patients, then the increase in lymphocyte apoptosis should correlate with disease activity. We observed that apoptosis was more prevalent in the PBLs of MS patients with the highest number of exacerbations during the 2 years prior to the study. Further, the number of relapses was positively and significantly correlated to the prevalence of apoptosis in several T lymphocyte subsets. This increase in T lymphocyte apoptosis in MS patients, and the statistical correlation with relapse frequency, do not support the generally accepted idea that an extended survival of T lymphocytes plays a pivotal pathophysiological role in MS (16–19).

Several works have described increased susceptibility of activated T cells to apoptosis (36, 37). Thus, our data of increased spontaneous apoptosis could be related to an increase of the percentage of these activated memory T cells in MS patients. In agreement with this interpretation, we observed that spontaneous apoptosis was positively correlated with the percentages of the CD45RO⁺ cells in both CD4 and CD8 T lymphocytes subsets in MS patients. Given that the expression of this CD45 isoform is restricted to previously activated T cells (38) these correlations clearly associate a higher degree of activation of CD4 and CD8 T lymphocytes with a higher susceptibility to apoptosis. However, we also found increased spontaneous apoptosis in MS patients even in the CD45RA naïve subsets from both CD4 and CD8 subsets. These last findings demonstrate that increased apoptosis of MS lymphocytes is not limited to activated T cells but also affects to naïve ones.

In this study, we have demonstrated an increased susceptibility to spontaneous apoptosis in the peripheral blood T cell compartment of these patients. Our finding might be interpreted to be in conflict with previously described decrease in apoptosis in autoreactive T cells from MS patients. Decreased apoptosis been reported after *in vitro* stimulation in myelin basic protein reactive T cells from MS patients (39) but this cells are only a little part of the memory T cell pool and to our knowledge these autoreactive T cells are not representative of the whole T cell compartment from MS patients.

Our findings might be interpreted to be in conflict with previously described increases in expression of antiapoptotic genes in peripheral blood lymphocytes from MS patients (16–19). These reports describe an increased expression of genes whose products have antiapoptotic activity, however, in these works there is not simultaneous analysis of the apoptosis of fresh peripheral blood T cells. Our findings clearly show the enhanced spontaneous apoptosis of

the peripheral blood T cell compartment from untreated MS patients and therefore the reported increases in the expression of some antiapoptotic mechanisms could represent an insufficient and inefficient homeostatic reaction to an increase of apoptosis in T cells from MS patients. It should also be noted that patients with inactivating mutations affecting genes responsible for the induction of lymphocyte apoptosis, as well as knock-out animals for these genes, show markedly increased absolute counts of T cells in peripheral blood (40). This lymphocytosis is not observed in MS patients who instead usually show lymphopenia rather than lymphocytosis (41).

Recently an increase in lymphocyte apoptosis has been proposed as cause of lymphopenic states (42). The homeostatic growth of lymphocytes to overcome lymphopenia is a mechanism of antigen independent growth and could be involved in an increased proliferation of autoreactive T cells. Therefore, increased lymphocyte apoptosis might be hypothesized as a cause of antigen independent growth of autoreactive T cells and subsequent expansion of autoreactive clones that initiate autoimmune diseases such as MS (38).

The pathogenic significance of the increase in spontaneous T cell apoptosis reported in this work cannot be established. It is clear that increased susceptibility to *ex vivo* apoptosis occurs in all the T cell subsets studied. It is also remarkable that CD19⁺ B cells are not affected. The generalized character of the T cell alteration suggests that increased susceptibility to apoptosis does not involve autoreactive lymphocytes exclusively. This interpretation is supported by the fact that the increase is also seen in the naïve CD45RA subset.

In agreement with previous reports, our results show a reduction in the percentage of CD3⁺CD8⁺ T cells in the blood of MS patients (43). Given that the CD8 T cells outnumber other types of infiltrating cells in the brain parenchyma of MS patients (44, 45), and that these, along with the memory phenotype, show an increased ability to be recruited in inflamed brain venules during the acute phases of the disease (46), the existence of a selective depletion of CD8 T cells in the peripheral blood of MS patients might be interpreted as a consequence of their claimed pathogenic role.

The observed high susceptibility of T lymphocytes from MS patients to spontaneous apoptosis appears clinically significant since it is clearly correlated with the number of relapses in the preceding 2 years. It is important to emphasize that this high susceptibility was found regardless of the clinical form of MS (RR or SP). Taken together, these findings indicate that increased susceptibility to spontaneous apoptosis is an abnormality of the T cell compartment associated with the inflammatory activity of

the disease rather than a feature of the clinical form of MS.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by grant, 03-1582, 00-0806, and 01/0566 from the Spanish *Fondo de Investigación de la Seguridad Social* (FIS, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, Spain) and by grant FIT-090000-2003-0105 from the Spanish *Ministerio de Ciencia y Tecnología* (PROFIT). We would like to thank Adrian Burton for his linguistic assistance. We thank Fernando García-Abril for editing the manuscript and coordinating efforts of the research group.

REFERENCES

1. Stinissen P, Raus J, Zhang J: Autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis: Role of autoreactive T lymphocytes and new immunotherapeutic strategies. *Crit Rev Immunol* 17:33–75, 1997
2. Ewing C, Bernard CC: Insights into the aetiology and pathogenesis of multiple sclerosis. *Immunol Cell Biol* 76:47–54, 1998
3. Hellings N, Raus J, Stinissen P: Insights into the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Immunol Res* 25:27–51, 2002
4. Traugott U, Reinherz EL, Raine CS: Multiple sclerosis: distribution of T-cell subsets within active chronic lesions. *Science* 219:308–310, 1983
5. Estes ML, Rudick RA, Barnett GH, Ranshoff RM: Stereotactic biopsy of an active multiple sclerosis lesion. Immunocytochemical analysis and neuropathologic correlation with magnetic resonance imaging. *Arch Neuro* 147:1299–1303, 1990
6. Raine CS, Scheinberg LC: On the immunopathology of plaque development and repair in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol* 20:189–201, 1988
7. Guillen C, Prieto A, Alvarez-Cermeño JC, de la Piedra M, Gimeno A, Alvarez-Mon M: Regulatory effects of cytokines and cyclosporine A on peripheral blood mononuclear cells from stable multiple sclerosis patients. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 21:527–549, 1999
8. Killestein J, Hintzen RQ, Uitdehaag BM, Baars PA, Roos MT, van Lier RA, Polman CH: Baseline T cell reactivity in multiple sclerosis is correlated to efficacy of interferon-beta. *J Neuroimmunol* 133:217–224, 2002
9. Zhang J, Markovic-Plese S, Lacet B, Raus J, Weiner HL, Hafler DA: Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 179:973–984, 1994
10. Trenn G, Kreuzfelder E, Hierholzer E, Scheiermann N, Bauer HJ, Bushart W: Age-associated T-lymphocyte activation through mitogens in patients with multiple sclerosis and blood donors. *Eur Neurol* 28:47–50, 1988
11. Markovic-Plese S, Cortese I, Wandinger KP, McFarland HF, Martin R: CD4 + CD28- costimulation-independent T cells in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 108:1185–1194, 2001
12. Killestein J, Rep MH, Barkhof F, Roos MT, Ader HJ, van Lier RA, Polman CH: Active MRI lesion appearance in MS patients is preceded by fluctuations in circulating T-helper 1 and 2 cells. *J Neuroimmunol* 118:286–294, 2001
13. Giunti D, Borsellino G, Benelli R, Marchese M, Capello E, Valle MT, Pedemonte E, Noonan D, Albini A, Bernardi G, Mancardi GL, Battistini L, Uccelli A: Phenotypic and functional analysis of T cells homing into the CSF of subjects with inflammatory diseases of the CNS. *J Leukoc Biol* 73:584–590, 2003
14. Ichikawa H, Ota K, Iwata M: Increased Fas antigen on T cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 71:125–129, 1996
15. Zipp F, Faber E, Sommer N, Muller C, Dichgans J, Krammer PH, Martin R, Weller M: CD95 expression and CD95-mediated apoptosis of T cells in multiple sclerosis. No differences from normal individuals and no relation to HLA-DR2. *J Neuroimmunol* 81:168–172, 1998
16. Sharief MK, Noori MA, Douglas MR, Semra YK: Upregulated survivin expression in activated T lymphocytes correlates with disease activity in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 9:503–510, 2002
17. Sharief MK, Noori MA, Zoukos Y: Reduced expression of the inhibitor of apoptosis proteins in T cells from patients with multiple sclerosis following interferon-beta therapy. *J Neuroimmunol* 129:224–231, 2002
18. Sharief MK, Semra YK: Down-regulation of survivin expression in T lymphocytes after interferon beta-1a treatment in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 59:1115–1121, 2002
19. Sharief MK, Douglas M, Noori M, Semra YK: The expression of pro- and anti-apoptosis Bcl-2 family proteins in lymphocytes from patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 125:155–162, 2002
20. Nguyen T, Russell J: The regulation of FasL expression during activation induced cell death (AICD). *Immunology* 103:426–434, 2001
21. Akbar AN, Borthwick N, Salmon M, Gombert W, Bofill M, Shamsadeen N, Pilling D, Pett S, Grundy JE, Janossy G: The significance of low bcl-2 expression by CD45RO T cells in normal individuals and patients with acute viral infections. The role of apoptosis in T cell memory. *J Exp Med* 178:427–438, 1993
22. Waiczies S, Weber A, Lunemann JD, Aktas O, Zschenderlein R, Zipp F: Elevated bcl-x (L) levels correlated with T cell survival in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 126:213–220, 2002
23. Gniadek P, Aktas O, Wandinger KP, Bellmann-Strobl J, Wengert O, Weber A, von Wussow P, Obert HJ, Zipp F: Systemic IFN β treatment induces apoptosis of peripheral blood immune cells in MS patients. *J Neuroimmunol* 137:187–196, 2002
24. Böyum AJ: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 21:77–89, 1968
25. Prieto A, Reyes E, Diaz D, Hernandez-Fuentes MP, Monserrat J, Perucha E, Munoz L, Vangioni R, de La Hera A, Orfao A, Alvarez-Mon M: A new method for the simultaneous analysis of growth and death of immunophenotypically defined cells in culture. *Cytometry* 39:56–66, 2000
26. Schmid I, Krall WJ, Uittenbogaart CH, Braun J, Giorgi JV: Dead cell discrimination with 7-aminoactinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry* 13:204–208, 1992
27. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C: A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184:39–51, 1995
28. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C: A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139:271–279, 1991

29. Prieto A, Díaz D, Barcenilla H, García Suárez J, Reyes E, Monserrat J, San Antonio E, Melero D, de la Hera A, Orfao A, Álvarez-Mon M: Apoptotic Rate: A new indicator for the quantification of the incidence of apoptosis in cell culture. *Cytometry* 48:185–193, 2002
30. Pozarowski P, Huang X, Halicka DH, Lee B, Johnson G, Darzynkiewicz Z: Interactions of fluorochrome-labeled caspase inhibitors with apoptotic cells: A caution in data interpretation. *Cytometry A* 55(1):50–60, 2003
31. Jaleco S, Swainson L, Dardalhon V, Burjanadze M, Kinet S, Taylor N: Homeostasis of naïve and memory CD4+ T cells: IL-2 and IL-7 differentially regulate the balance between proliferation and Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 171:61–68, 2003
32. Thome M, Tschopp J: Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat Rev Immunol* 1:50–58, 2001
33. Madakamuttil LT, Maricic I, Sercarz E, Kumar V: Regulatory T cells control autoimmunity *in vivo* by inducing apoptotic depletion of activated pathogenic lymphocytes. *J Immunol* 170:2985–2992, 2003
34. Grondal G, Traustadottir KH, Kristjansdottir H, Lundberg I, Klareskog L, Eriendsson K, Steinsson K: Increased T-lymphocyte apoptosis/necrosis and IL-10 producing cells in patients and their spouses in Icelandic systemic lupus erythematosus multigene families. *Lupus* 11:435–442, 2002
35. Henandez MP, Reyes E, Prieto A, Zea A, Villa L, Sanchez-Atrio A, Esquivel F, Alvarez-Mon M: Defective proliferative response of T lymphocytes from patients with inactive systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 26:1518–1526, 1999
36. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, Orenstein JM, Kotler DP, Fauci AS: HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of the disease. *Nature* 362:355–358, 1993
37. Grzegorzczak J, Kowalski ML, Pilat A, Iwaszkiewicz J: Increased apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with perennial allergic asthma/rhinitis: Relation to cell markers of apoptosis. *Mediators Inflamm* 11:225–233, 2002
38. Johannisson A, Festin R: Phenotype transition of CD4+ T cells from CD45RA to CD45RO is accompanied by cell activation and proliferation. *Cytometry* 19:343–352, 1995
39. Zang YC, Kozovska MM, Hong J, Li S, Mann S, Killian JM, Rivera VM, Zhang JZ: Impaired apoptotic deletion of myelin basic protein-reactive T cells in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 29:1692–1700, 1999
40. Adachi M, Suematsu S, Suda T, Watanabe D, Fukuyama H, Ogasawara J, Tanaka T, Yoshida N, Nagata S: Enhanced and accelerated lymphoproliferation in Fas-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2131–2136, 1996
41. Kreuzfelder E, Shen G, Bittorf M, Scheiermann N, Thraenhart O, Seidel D, Grosse-Wilde H: Enumeration of T, B and natural killer peripheral blood cells of patients with multiple sclerosis and controls. *Eur Neurol* 32:190–194, 1992
42. Marleau AM, Sarvetnick N: T cell homeostasis in tolerance and immunity. *J Leukoc Biol* 78:575–584, 2005
43. Ilonen J, Surcel HM, Jagerroos H, Nurmi T, Reunanen M: T lymphocyte subsets defined by double immunofluorescence in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 81:128–130, 1990
44. Haring JS, Pewe LL, Perlman S: Bystander CD8 T cell-mediated demyelination after viral infection of the central nervous system. *J Immunol* 169:1550–1555, 2002
45. Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H: Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci* 25:313–319, 2002
46. Battistini L, Piccio L, Rossi B, Bach S, Galgani S, Gasperini C, Ottoboni L, Ciabini D, Caramia MD, Bernardi G, Laudanna C, Scarpini E, McEver RP, Butcher EC, Borsellino G, Constantin G: CD8+ T cells from patients with acute multiple sclerosis display selective increase of adhesiveness in brain venules: A critical role for P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood* 101:4775–4782, 2003



available at www.sciencedirect.com

Clinical Immunology

www.elsevier.com/locate/yclim



IFN β therapy progressively normalizes the increased *ex vivo* T lymphocyte apoptosis observed in active patients with multiple sclerosis

Antonio García-Merino^{a,1}, Hugo Barcenilla^{b,1}, David Díaz^b,
Jorge Monserrat^b, Alfredo Prieto^b, Melchor Álvarez-Mon^{b,c,*}
for the Genio II group

^a Neuroimmunology Unit, Clínica Puerta de Hierro, Universidad Autónoma de Madrid, Spain

^b Oncology and Immune System Diseases Laboratory, CNB-CSIC R and D Associated Unit, IMMPA, Department of Medicine, University of Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, Spain

^c Immune System Diseases and Oncology Service, University Hospital "Príncipe de Asturias", Alcalá de Henares, Madrid, Spain

Received 4 June 2008; accepted with revision 17 April 2009

Available online 13 May 2009

KEYWORDS

Lymphocyte apoptosis;
Interferon beta;
Multiple sclerosis;
Flow cytometry

Abstract Abnormal apoptosis has been reported in circulating T lymphocytes in patients with multiple sclerosis. The effects of 12 months of IFN β treatment in T and B lymphocyte spontaneous *ex vivo* apoptosis were studied in patients with MS. Peripheral blood mononuclear cells were obtained from 48 patients before and at 1, 6 and 12 months after treatment with IFN β . Spontaneous *ex vivo* apoptosis was quantified by four-color flow cytometry. A significant reduction and normalization of the percentage of apoptotic cells was found in all T lymphocyte subsets. B cell apoptosis values were unaffected by therapy; Relapses of the clinical activity of the disease were associated to transitory upturns of lymphocyte apoptosis. In conclusion, IFN β therapy progressively normalizes the increased *ex vivo* T lymphocyte apoptosis observed in MS. However, it is not clear if this reduction in spontaneous T lymphocyte apoptosis is due to direct effect of IFN β or secondary to decreased clinical and sub-clinical activity.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an immune-mediated, demyelinating disease characterized by the presence of inflammatory cells in the central nervous system (CNS). It is accepted that high numbers of these cells access the nervous tissue across the blood-brain barrier (BBB) from the periphery in a continuous way. Once in the CNS, they trigger a cascade of inflammatory phenomena eventually leading to demyelination and tissue scarring. CD4⁺ T lymphocytes seem to play a

* Corresponding author. Departamento de Medicina, Universidad de Alcalá, Carretera Madrid-Barcelona, Km 33.600, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain. Fax: +34 1 8854526.

E-mail address: hugo.barcenilla@uah.es (H. Barcenilla).

¹ Both authors contributed equally to this work and are joint first authors.

crucial role in the orchestration of the autoimmune attack, with an increasingly recognized role of both T lymphocytes and B cells [1–3]. Peripheral blood lymphocytes (PBLs) from patients with MS display a number of abnormalities such as increased proliferate responses to polyclonal stimulation and expansion of IL-2-responsive myelin-reactive T cells [4,5]. Circulating T lymphocytes show an inadequate stage of activation that seems to be critical for crossing BBB [6–9].

Apoptosis of autoreactive T cells in periphery is an essential mechanism of tolerance and control of autoimmunity. Thanks to the knowledge obtained from experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the animal model of MS, it is accepted that a majority of the infiltrating lymphoid cells are cleared from the CNS by programmed cell death, a mechanism that contributes to control inflammation [10]. Drugs that suppress EAE such as corticosteroids are strong inducers of T cell apoptosis. Manipulation aimed to modify the rate of apoptosis of encephalitogenic cells is followed by changes in the clinical expression of EAE: an increase in the apoptotic rate of these cells in the CNS alleviates the disease [11] whereas a decrease makes the outcome worse [12]. In keeping with these ideas it has been hypothesized that abnormalities in the apoptotic control of some lymphocytes could be one of the pathogenic clues of MS.

In experimental models of MS, increased T and B lymphocyte apoptosis has been found [13]. In active patients with MS, increased apoptosis of circulating T lymphocytes has been reported [14]. It has been observed that the T lymphocyte apoptosis susceptibility may be modified by the glatiramer acetate treatment in patients with MS [15].

In this translational study, we have investigated the immunomodulatory effects of IFN β treatment on circulating T and B lymphocyte *ex vivo* spontaneous apoptosis of patients with untreated relapsing-remitting (RR) and secondary progressive (SP) MS. The patients were analyzed before starting IFN β treatment and at one, six and twelve months of treatment and the potential association between the immune and clinical responses was analyzed.

Materials and methods

Patients

This study was designed as a single-blinded, multicenter study, with untreated patients with RR and SP MS from Spain. Patients were enrolled at 9 tertiary care hospitals by certified neurologists with expertise in the field of MS. The institutional review boards approved the study and all patients gave their informed consent.

Forty-eight patients fulfilled the following inclusion criteria: 1. Clinically definite MS according to Poser's criteria; 2. A range of $\leq 5 \cdot 5$ in the Expanded Disability Status Scale (EDSS); 3. Clinically active disease, defined by at least two relapses in the previous two years, or an increase of 1 point in the EDSS, unrelated to relapses. Exclusion criteria comprised all contraindications for IFN β -1b, use of any immunosuppressant or immunomodulating agent in the 2 years prior to study entry, occurrence of a relapse within the 3 months prior to the study entry, use of steroids within the same 3 month period of time, and absence of informed consent.

Four visits were planned: at baseline and on months 1, 6 and 12. The initial visit included clinical information on age, gender, age at onset of MS, dates of relapses in the previous 2 years, EDSS, and laboratory data. The rest of the visits included EDSS, information on possible relapses between visits, and concomitant treatments. Patients suffering a relapse might be treated with high-dose intravenous steroids for a maximum of 5 days; in those cases, time and dose were recorded and an additional immunological analysis was carried out before the institution of steroids. IFN β -1b was administered according to the standard regime of 250 μ g subcutaneously every other day.

Blood analyses

Laboratory determinations comprised complete blood cell count, hemoglobin, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, creatinine, bilirubin, TSH, T4, and a pregnancy test if applicable, carried out at baseline, 1, 6 and 12 months after starting therapy. For immunophenotype characterization and apoptosis studies, 30 ml of heparinized blood, refrigerated at 4 °C, were sent to the central laboratory (Immunology Laboratory at University of Alcalá) to be processed within 24 h of withdrawal. To ensure blinding of the determinations, clinical information regarding patients' characteristics was not provided to the central laboratory.

As a reference for baseline determinations, blood samples from 12 healthy volunteers, 7 males and 5 females with a mean age of 32.08 years \pm 5.63 SD were also included.

Cell separation and cell cultures

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained by Ficoll-Hypaque (Lymphoprep Nyegaard and Co., Oslo, Norway) and resuspended in complete medium consisting of RPMI 1640 (Whitaker Bioproducts, Verviers, Belgium) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 25 mM Hepes (Biochrom KG) and 1% penicillin–streptomycin (Whitaker Bioproducts). Cell viability of fresh PBMC was checked by both trypan blue (light microscopy) and 7-aminoactinomycin D (flow cytometry) exclusion [16] and was always greater than 95%.

Lymphocytes (50,000 cells/well) were cultured in duplicate with complete medium in 96 flat-bottom plates for 24 h at 37 °C, in a humidified atmosphere containing 5% CO $_2$. Spontaneous apoptosis was studied by culture without apoptosis inducer compounds.

Quantification of apoptotic cells

Apoptosis within the different subsets was determined after 24 hour culture using the following methods:

1. Quantification of annexin positive apoptotic cells. Cells were incubated with combinations of three-color MoAbs combinations with PE, PerCP and APC-labeled MoAbs. After antibody incubation for 20 min at 4 °C and, before centrifugation, cells were diluted in fresh complete medium to optimize subsequent cell wash. The wash procedure consisted of a 5 min, 300 g centrifugation at

Table 1 Demographic and clinical characteristics of patients with MS.

Total number of cases	48	
Cases completing follow-up	46 (95.8%)	
Age (mean, SD) (years)	37 \pm 11	
Sex (F/M)	31 (64.6%)/17 (35.4%)	
Age at diagnosis (mean, SD) (years)	28 \pm 12	
Type of MS: cases (%)		
RR	27 (56.3%)	
SP	21 (43.7%)	
EDSS (mean, SD)	3 \pm 2	
Relapses in previous 2 years	RR (n=27)	SP (n=21)
Yes	27 (100%)	15 (71.4%)
No	0 (0%)	6 (28.6%)
Relapses during study		
Yes	9 (33.3%)	6 (28.6%)
No	18 (66.7%)	15 (71.4%)

4 °C, followed by cell resuspension in Ca²⁺-binding buffer (Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, MgCl 1 mM, CaCl 1.8 mM, and KCl 5 mM (Sigma Chemical Company St. Louis, MO)) adjusted to pH 7.4. Cells were then labeled with a solution of annexin V-FITC diluted in Ca²⁺-binding buffer for 10 min to identify early apoptotic cells. Anti-CD4-PerCP, anti-CD45RO-APC, anti-CD8-PerCP, anti-CD3-APC and anti-CD19-APC MoAbs were obtained from Becton and Dickinson (Mountain View, CA, USA). Anti-CD45RA-PE and anti-CD5-PE MoAbs were obtained from Caltag (San Francisco, CA). Control studies with unstained cells and cells incubated with isotype-matched irrelevant PE-, PerCP and APC-labeled MoAbs were performed for each experiment. Acquisition and analysis for the four-color fluorescence procedures were carried out with a FACScalibur flow cytometer (Becton and Dickinson) using Cellquest software (Becton and Dickinson). In order to clearly discriminate debris from

nonviable cells, a fraction of cells was incubated for 3 min with 7-AAD (Sigma) at a final concentration of 2.5 g/ml in Ca²⁺-binding buffer. Debris was discriminated by a forward scatter (FSC)/FL-3 dot plot in which FL-3 corresponded to 7-AAD-associated fluorescence. In this plot, the combination of size and DNA fluorescence criteria provides a rationale for discrimination between debris and apoptotic cells. Fragments with very low 7-AAD fluorescence were considered to be cell debris with either none or very little DNA and were excluded from cell gates. On the contrary, small fragments with 7-AAD fluorescence intensity similar to that of dead cells of greater size were considered to be apoptotic cells. To calculate the percentage of apoptotic cells from each lymphocyte subset, both whole dead cells and viable cells were gated on a bivariate FSC/SSC dot plot.

- Quantification of apoptotic nuclei by hypodiploid DNA content. This determination of apoptotic cells was

Table 2 Patients with T and B lymphocyte spontaneous apoptosis values above the range of values of healthy controls.

	Healthy controls	Patients above healthy controls range	
	Range of apoptotic cells (minimum %–maximum %)	Baseline n=46 Number (%)	Post-treatment n=46 Number (%)
CD3+	(3.61–16.28)	26 (56)	5 (11)*
CD3+CD8+	(2.57–12.42)	26 (56)	7 (15)*
CD3+CD4+	(1.71–13.53)	23 (50)	5 (11)*
CD4+CD45RA+	(0.91–7.53)	27 (58)	6 (13)*
CD8+CD45RA+	(1.61–8.24)	30 (65)	11 (23)*
CD4+CD45RO+	(2.90–21.59)	20 (44)	4 (9)*
CD8+CD45RO+	(3.37–16.75)	26 (56)	12 (26)*
CD19+	(10.71–55.49)	2 (4)	1 (2)
CD19+CD5+	(0.77–13.99)	13 (29)	6 (13)†
LMW DNA	(0.35–13.41)	23 (50)	15 (33)†

Data show numbers and percentages of patients with MS whose values of spontaneous apoptosis are above the upper limit of the range of the group of healthy controls. T lymphocyte spontaneous apoptosis after 24 h of culture was increased in more than half of patients with MS. After a year of IFN β treatment the proportion of patients with values outside the range of the controls decreased significantly for all studied T cell subsets and also for the CD5+CD19+ subset. Similar results were found for the apoptotic cells measured by LMW DNA extraction. *Indicates a *p* value < 0.01, and † a *p* value < 0.05 between baseline and post treatment in the proportions of patients with MS over the control range (Chi square test).

based on the loss of low molecular weight (LMW) DNA as described [17]. Briefly, after 24 h of culture, PBMCs were treated with a citrate buffer containing 0.1% Triton X-100 (Sigma Chemical Company) to extract LMW DNA from the nuclei of apoptotic cells. The remaining DNA cell content was stained with propidium iodide (PI, Sigma Chemical Company). Cells with hypodiploid DNA content (apoptotic cells) were distinguished from cells with normal diploid DNA content (non apoptotic) by measuring PI-associated fluorescence intensity on a flow cytometer.

The percentage of apoptotic cells (annexin V+ or hypodiploid cells) was calculated by using an apoptotic index according to the following formula:

$$\text{Apoptosis index (AI)} = 100 \times (\text{Apo}/(\text{Apo} + \text{Non Apo}))$$

where: Apo = represents the percentage of apoptotic cells (annexin V positive cells or hypodiploid cells in the LMW DNA extraction procedure) and Non Apo = represents the percentage of non apoptotic cells (annexin V negative cells or cells with diploid DNA content in the LMW DNA extraction procedure).

Statistical analysis

Correlation between the 2 methods used for quantification of apoptotic cells was analyzed by the Spearman's rank correlation test. For comparison of results between patients and controls at baseline, and for each lymphocyte subpopulation, the *p* value was obtained by using a non parametric Student's *T* test. To compare apoptotic determinations of each lymphocyte subpopulation, an intrasubject variance analysis was applied. A Wilcoxon test was used for further comparisons between paired visits. Significant values were considered for a *p* < 0.05.

Results

IFN β treatment normalizes the increased T lymphocyte apoptosis in patients with MS

Demographic and clinical characteristics of the patients studied at baseline and during follow-up are shown in Table 1. Two patients withdrew from the study: one of them voluntarily, and the other because of severe depression.

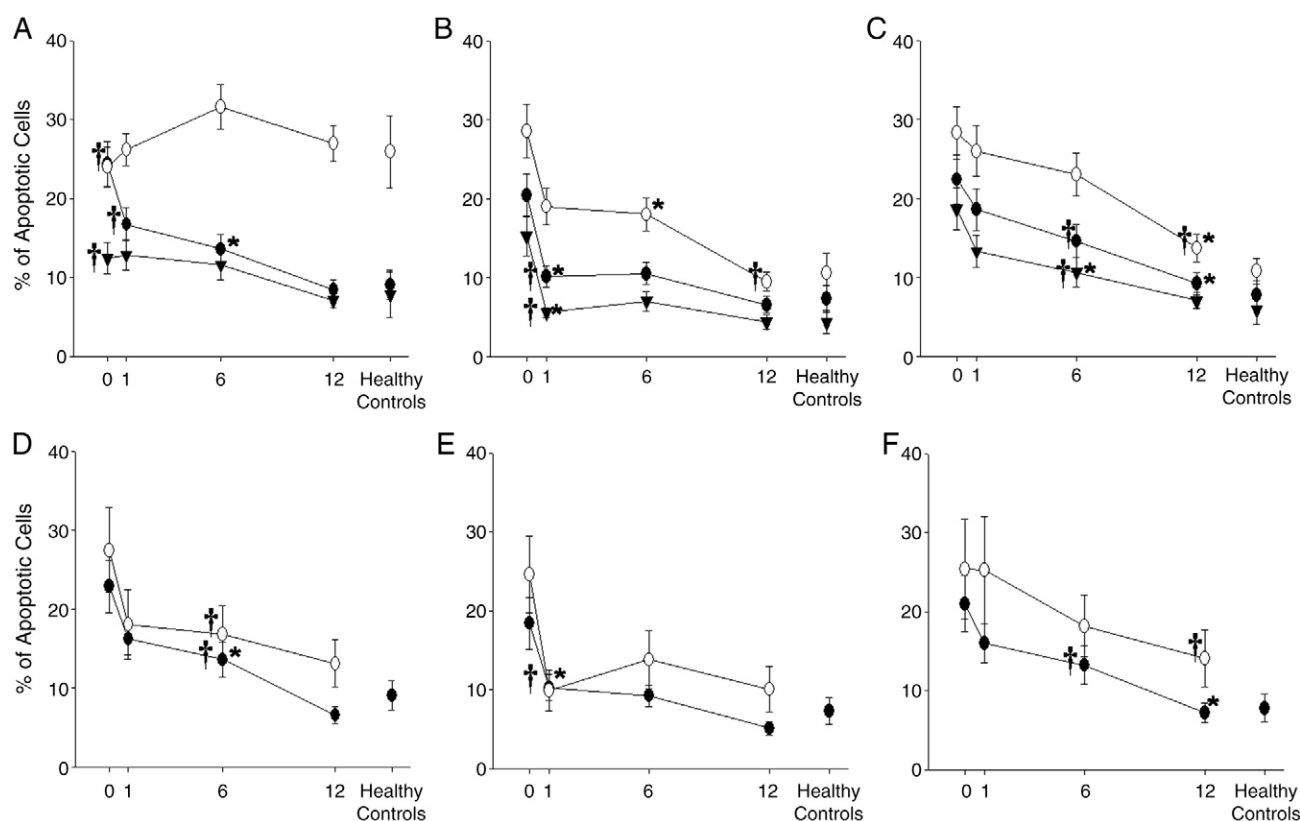


Figure 1 IFN β treatment decreases the spontaneous apoptosis in several PB T cell subsets. The time evolution of percentages of apoptotic cells from several lymphocyte subsets in patients with MS treated with IFN β -1b and healthy controls is shown. Data of quantification of apoptotic cells are represented as mean percentage \pm SEM. Panel A shows the percentages of apoptotic cells within CD3+ (●), CD19+ (○) and CD19+CD5+ (▼) populations. Panel B shows the percentages of apoptotic cells within CD3+CD4+ (●), CD4+CD45RA+ (▼) and CD4+CD45RO+ (○) populations. Panel C shows the percentages of apoptotic cells within CD3+CD8+ (●), CD8+CD45RA+ (▼) and CD8+CD45RO+ (○) populations. Panels D, E and F represent the percentage of apoptotic cells within CD3+, CD3+CD4+ and CD3+CD8+ T cell populations respectively from patients without (●) or with (○) relapses during the IFN β treatment. * Indicates the first significant difference with baseline values. † Indicates the first determination in which the percentages of apoptotic cells of patients with MS do not differ statistically from healthy control values.

Table 3 Lymphocyte apoptosis values in non relapsing MS patients are lower than relapsing MS patients.

Relapses in the previous 2 years

Lymphocyte subpopulation	SPMS No (n=5) Mean \pm SD	SPMS Yes (n=12) Mean \pm SD (p value)	RRMS Yes (n=25) Mean \pm SD (p value)
CD3+	8.04 \pm 6.57	29.46 \pm 20.52 (0.0162)	24.23 \pm 17.94 (0.0107)
CD3+CD8+	5.54 \pm 4.02	31.00 \pm 24.83 (0.0200)	22.06 \pm 21.45 (0.0035)
CD3+CD4+	4.22 \pm 3.20	25.65 \pm 22.66 (0.0067)	20.93 \pm 16.15 (0.0045)
CD4+CD45RA+	1.24 \pm 0.93	20.21 \pm 22.86 (0.0067)	15.44 \pm 14.22 (0.0008)
CD8+CD45RA+	2.13 \pm 1.57	26.70 \pm 20.25 (0.0067)	18.84 \pm 16.52 (0.0004)
CD4+CD45RO+	9.88 \pm 6.04	34.72 \pm 25.94 (0.0162)	29 \pm 20 (0.0188)
CD8+CD45RO+	7.35 \pm 3.07	35.80 \pm 26.34 (0.0130)	29.47 \pm 20.34 (0.0001)
CD19+	14.19 \pm 9.73	31.71 \pm 25.51 (0.1459)	21.8 \pm 11.3 (0.1694)
CD19+CD5+	4.81 \pm 3.98	15.70 \pm 18.22 (0.2847)	12.99 \pm 11.07 (0.0743)

Comparison of lymphocyte apoptosis values between the group of SP MS with no relapses prior to therapy versus relapsing SP and RR MS patients. The *p* value was calculated by using a non parametric Wilcoxon test.

Spontaneous ex vivo T lymphocyte apoptosis, determined by annexin V labeling, was significantly higher in untreated patients with MS compared to healthy controls (Table 2 and Fig. 1). Before starting IFN β treatment, more than half of the patients with MS had apoptosis values in T lymphocyte subsets above the upper limit range of the reference control. For CD19+CD5+ B cells, these differences were also significant, although less pronounced (Table 2). We did not find any differences in lymphocyte apoptosis levels between RR and SP

MS groups (data not shown). We found significant differences between the non relapsing SP patients and both the relapsing SP group and the relapsing RR group (Table 3). The percentage of apoptotic lymphocytes was also measured by LMW DNA extraction and similar results were found (Table 2).

Next, we investigated the percentage of apoptotic cells in circulating T and B cells from patients with MS treated with IFN β at 1, 6 and 12 months of follow-up. Compared to values at baseline, IFN β treatment induced a marked reduction of

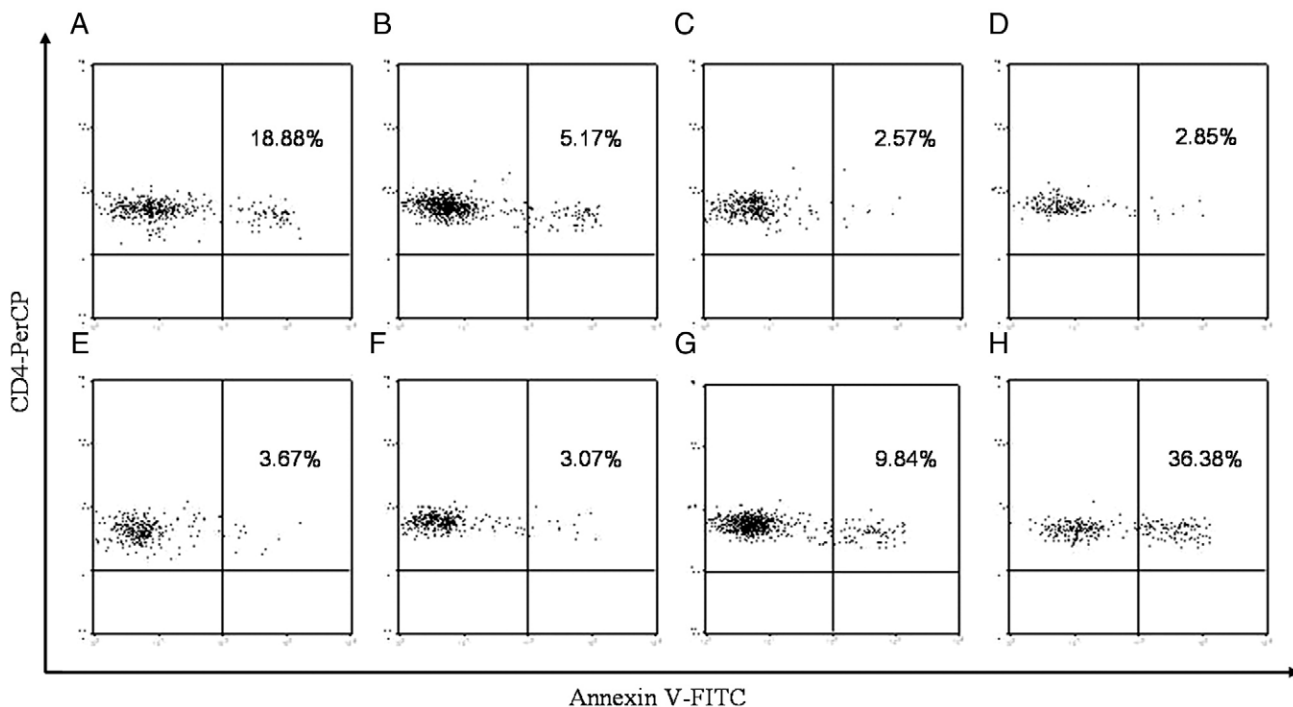


Figure 2 Spontaneous apoptosis in CD3+CD4+ T cells from representative patients with MS and a healthy control. Apoptotic CD3+CD4+ T cells were identified by annexin V binding after 24 h of ex vivo culture. Each plot represents the percentage of apoptotic CD3+CD4+ T cells. Panels A–D show percentages of apoptotic CD3+CD4+ cells from a representative RRMS patient at: baseline (panel A), 1 month of treatment (panel B), 6 months of treatment (panel C) and 12 months of treatment (panel D). Panel E shows the percentage of apoptotic CD3+CD4+ cells from a representative healthy control. Panel F shows the percentage of apoptotic CD3+CD4+ cells from a representative non relapsing SP patient. Panels G–H show the percentages of apoptotic CD3+CD4+ cells from a representative RR patient who suffered a relapse despite IFN β treatment. Panel G at baseline and panel H during the relapse.

the percentage of apoptotic cells reaching normal levels in all T lymphocyte subpopulations. Figure 1 shows that a significant reduction and normalization in the percentage of apoptotic cells in CD3+CD4+ and CD4+ CD45RA+ T lymphocyte subsets was reached at month 1 ($p=0.003$ and $p=0.001$ respectively). For CD3+, CD8+CD45RA+, and CD4+CD4RO+ T lymphocytes significant reduction in the percentage of apoptotic cells was observed at 6 months of treatment ($p=0.014$, $p=0.016$ and $p=0.05$ respectively), whereas in CD3+CD8+ and CD8+ CD45RO+ T lymphocyte subset was observed at 12 months ($p=0.002$ and $p=0.001$ respectively). Apoptosis normalization occurred for CD3+ subset at 1 month, for CD3+CD8+ and CD8+CD45RA+ subsets at 6 months and for CD4+CD45RO+ and CD8+ CD45RO+ at 12 months. Apoptosis values in the whole B cell population were unmodified by therapy. We have also compared spontaneous apoptosis values of lymphocytes from patients with relapses or without relapses during the IFN β treatment (Fig. 1, panels D–F). At baseline for all T cell subsets, patients who eventually suffered relapses presented higher apoptosis values than those who did not suffer relapses but this difference did not reach statistical significance. Furthermore, the kinetic of normalization of apoptosis of CD8+ T cells from patients with relapses was significantly slower than other T cell subsets. Figure 2 shows a dot-plot analysis of apoptosis in CD3+CD4+ lymphocytes for a representative non relapsing RRMS patient before and at 1, 6 and 12 months of treatment (panels A–D) and a healthy control (panel E).

After 12 months of IFN β treatment the proportion of patients with values outside the range of the controls decreased significantly for all studied T cell subsets (Table 2).

Relapse of the disease in IFN β treated patients is associated to an increase in lymphocyte apoptosis

We studied the spontaneous apoptosis of 8 patients that suffered a relapse of the disease during the 12 months of IFN β treatment. We observed that during the relapses and

before the use of steroids the spontaneous apoptosis in all lymphocyte subpopulations was significantly higher than that observed in the next planned visit (post relapse sample) ($p<0.05$) (Fig. 3). Similar results were found for LMW DNA extraction ($p<0.05$). Results from a representative RRMS patient who suffered a relapse are shown in Figure 2 (panels G–H). Results from a representative patient of the non relapsing SP MS patient are shown in Figure 2 (panel F).

Discussion

In this work we have found significant effects of IFN β therapy on spontaneous apoptosis of peripheral blood T lymphocytes from patients with MS. This cytokine treatment is able to significantly normalize the high increased susceptibility to apoptosis of circulating T lymphocytes of patients with MS.

In this translational study, we have found that more than a half of untreated patients with RR and SP MS had an abnormally increased spontaneous T lymphocyte apoptosis, in agreement with previous findings [14]. This high apoptosis susceptibility was similar in both clinical forms of MS and was associated to the activity of the disease. This association is supported by two facts: 1) non relapsing patients showed normal values of apoptosis incidence and 2) the patients who suffered relapses when they were receiving IFN β therapy showed a marked increase in susceptibility to apoptosis during the relapse.

Our data show that the increased *ex vivo* spontaneous apoptosis found in T lymphocytes from patients with MS can be normalized by IFN β therapy. The number of patients with values of apoptosis above the upper limit range of controls is reduced from 55% to a 15% of the patients after one year of treatment. This immunomodulatory effect of IFN β therapy is gradual and occurs at different rates depending on the subpopulation studied: CD4 T cells reach control values at the first month of treatment while CD8 T cells reach normal values only after six months of treatment. In the same way, CD45RA+ subsets either of CD4 or CD8 T cells reach normal

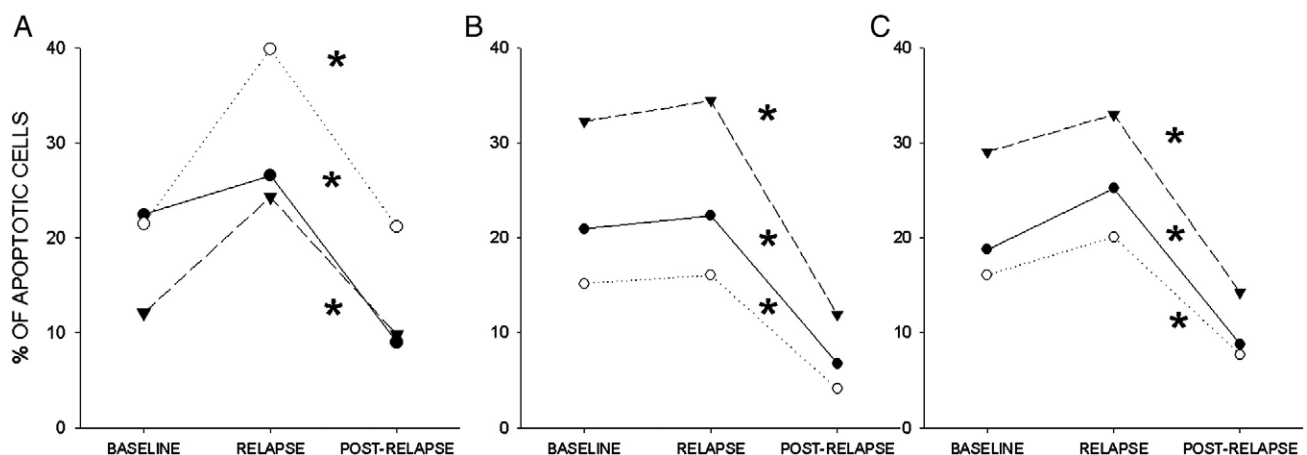


Figure 3 Spontaneous *ex vivo* apoptosis of T cell subsets from patients with MS increases during relapses. Time evolution of the median percentages of apoptotic cells from several lymphocyte subsets in 8 patients with MS who suffered relapses despite IFN β -1b treatment. Panels A, B and C show spontaneous apoptosis in different lymphocyte subsets. Panel A shows the percentages of apoptotic cells within CD3+ (●), CD19+ (○) and CD19+CD5+ (▼) populations. Panel B shows the percentages of apoptotic cells within CD3+CD4+ (▼), CD4+CD45RA+ (○) and CD4+CD45RO+ (●) populations. Panel C shows the percentages of apoptotic cells within CD3+CD8+ (▼), CD8+CD45RA+ (○) and CD8+CD45RO+ (●) populations. * Indicates a significant decrease from relapse to post relapse values.

values before CD45RO+ subsets. Moreover, IFN β therapy does not affect the normal apoptosis susceptibility of CD19+ B cells, a lymphocyte subpopulation that not had impaired spontaneous apoptosis.

Our results are in contradiction with previous reports claiming the impairment of the apoptotic pathways in lymphocytes from patients with MS indicating a resistance to apoptosis. These works have reported a subtle decrease of apoptosis in untreated patients with MS [18,19] and an increase after treatment with IFN β [20–22]. This discrepancy might be attributed to the different experimental procedures to determine the incidence of apoptosis or the selection of patients. Sharief et al. describe increases in expression of antiapoptotic proteins [18,19] which are downregulated after IFN β treatment [20,21]. However, they did not determine the incidence of spontaneous lymphocyte apoptosis but other surrogate parameters such as DNA fragmentation or Fas expression that are not direct measurements of the proportion of cells undergoing apoptosis. Gniadek et al. studied spontaneous lymphocyte apoptosis at the single cell level [22]. This work was carried out, however, in frozen/thawed cells, a technical procedure that may cause significant variations in lymphocyte apoptosis susceptibility. In fact an analysis of their validation procedure shows a median coefficient of variation of 44% between replicated samples of fresh and frozen cells. This was a high value for the assessment of subtle differences in percentages of apoptotic cells before and after treatment (1.1%) considering that the median variation of this measurement between each pair of replicated samples of fresh and frozen cells was 6%.

The mechanism by which IFN β treatment modulates the apoptosis of T lymphocytes from patients with MS has not been established. Either direct effects of IFN β on T cells or indirect activities through other immune system cells involved in the inflammatory response may be postulated. Type 1 interferons, such as IFN β , prevent the rapid death of activated T cells [23]; however, modulation of cytokine production toward the anti-inflammatory phenotype [24] might be more relevant. In several autoimmune, allergic and infectious diseases, increased *ex vivo* apoptosis of peripheral blood T cells has been demonstrated [25–28]. The increased apoptosis observed in T lymphocytes in an inflammatory disease could be related to the intensity of inflammatory reactions in the lymphoid environment. We have previously published the correlation existent between high susceptibility to spontaneous apoptosis with the number of relapses of patients with MS [14], here we have observed an increase of spontaneous apoptosis during the relapse, moreover, this increase occurs in all T cell subsets studied indicating a generalized proapoptotic reaction of peripheral blood T cells to the inflammatory environment. The fact that patients with relapses during the IFN β treatment showed a normalization of spontaneous apoptosis after the relapse suggests an effect of IFN β on susceptibility to apoptosis even on those patients that suffered relapses. Our data show that long-term IFN β treatment of patients with MS has a marked immunomodulatory effect on circulating T cell compartment with restoration of normal levels of spontaneous apoptosis.

Future works have to establish the potential clinical value of the analysis of T lymphocyte apoptosis for the optimization

and individualization of IFN β treatment in patients with MS.

Acknowledgments

The Genio II group included the following persons:

Dr. Pablo Barreiro Tella, Hospital La Paz, Madrid
 Dra. Clara de Andrés Frutos and Dra Ma Luisa Martínez Ginés, Hospital Gregorio Marañón, Madrid
 Dr. Bonaventura Casanova i Estruch, Hospital La Fe, Valencia
 Dr. Rosario Blasco Quilez, Hospital Puerta de Hierro, Madrid
 Dr. Jesus Martin Martínez, Hospital Miguel Servet, Zaragoza
 Dr. Francisco Coret Ferrer, Hospital Clinico, Valencia
 Dr. Jose Carlos Alvarez-Cermeño and Dr. Jose Francisco Plaza Nieto, Hospital Ramón y Cajal, Madrid
 Dr. Julian Benito-Leon, Hospital Mostoles
 Dr. Asunción Morales Otal and Dr. Ma Cruz Gutierrez del Olmo, Hospital Doce de Octubre, Madrid

This work was partially supported by grants from the Fondo de Investigación de la Seguridad Social (FIS, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, Spain), the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (PROFIT), MITIC-CM (Ref.: S-BIO-0189/2006) and the Lilly Foundation.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.clim.2009.04.006](https://doi.org/10.1016/j.clim.2009.04.006).

References

- [1] N. Hellings, J. Raus, P. Stinissen, Insights into the immunopathogenesis of multiple sclerosis, *Immunol. Res.* 25 (2002) 27–51.
- [2] L. Steinman, Myelin-specific CD8 T cells in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis, *J. Exp. Med.* 19 (2001) 27–30.
- [3] J.J. Archelos, M.K. Storch, H.P. Hartung, The role of B cells and autoantibodies in multiple sclerosis, *Ann. Neurol.* 47 (2000) 694–706.
- [4] C. Guillen, A. Prieto, J.C. Alvarez-Cermeño, M. de la Piedra, A. Gimeno, M. Alvarez-Mon, Regulatory effects of cytokines and cyclosporine A on peripheral blood mononuclear cells from stable multiple sclerosis patients, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 21 (1999) 527–549.
- [5] J. Zhang, S. Markovic-Plese, B. Lacet, J. Raus, H.L. Weiner, D.A. Hafler, Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis, *J. Exp. Med.* 179 (1994) 973–984.
- [6] S. Markovic-Plese, I. Cortese, K.P. Wandinger, H.F. McFarland, R. Martin, CD4+CD28– costimulation-independent T cells in multiple sclerosis, *J. Clin. Invest.* 108 (2001) 1185–1194.
- [7] J. Killestein, M.H. Rep, F. Barkhof, M.T. Roos, H.J. Ader, R.A. van Lier, C.H. Polman, Active MRI lesion appearance in MS patients is preceded by fluctuations in circulating T-helper 1 and 2 cells, *J. Neuroimmunol.* 118 (2001) 286–294.
- [8] D. Giunti, G. Borsellino, R. Benelli, M. Marchese, E. Capello, M.T. Valle, E. Pedemonte, D. Noonan, A. Albin, G. Bernardi, G.L. Mancardi, L. Battistini, A. Uccelli, Phenotypic and

- functional analysis of T cells homing into the CSF of subjects with inflammatory diseases of the CNS, *J. Leukoc. Biol.* 73 (2003) 584–590.
- [9] G. Trenn, E. Kreuzfelder, E. Hierholzer, N. Scheiermann, H.J. Bauer, W. Bushart, Age-associated T-lymphocyte activation through mitogens in patients with multiple sclerosis and blood donors, *Eur. Neurol.* 28 (1988) 47–50.
- [10] J. Bauer, H. Wekerle, H. Lassmann, Apoptosis in brain-specific autoimmune disease, *Curr. Opin. Immunol.* 7 (1995) 839–843.
- [11] T.T. Chang, R.A. Sobel, T. Wei, R.M. Ransohoff, V.K. Vuchroo, A.H. Sharpe, Recovery from EAE is associated with decreased survival of encephalitogenic T cells in the CNS of B7-1/B7-2-deficient mice, *Eur. J. Immunol.* 33 (2003) 2022–2032.
- [12] C. Puerta, I. Martinez, P. Baranda, M.R. Blasco, R. Castejon, J.A. Vargas, A. Garcia-Merino, Aminoguanidine reduces apoptosis of circulating V Beta 8.2 T lymphocytes in Lewis rats with actively induced experimental autoimmune encephalomyelitis. Association with persistent inflammation of the central nervous system and lack of recovery, *J. Neuroimmunol.* 110 (2000) 140–150.
- [13] I. Tsunoda, J.E. Libbey, L.Q. Kuang, E.J. Terry, R.S. Fujinami, Massive apoptosis in lymphoid organs in animal models for primary and secondary progressive multiple sclerosis, *Am. J. Pathol.* 167 (2005) 1631–1646.
- [14] A. Prieto, D. Diaz, H. Barcenilla, C. Castrillo, J. Monserrat, A.G. Merino, M. Alvarez-Mon, GENIO II-group, Increased spontaneous *ex vivo* apoptosis and subset alterations in peripheral blood T cells from patients with multiple sclerosis, *J. Clin. Immunol.* 26 (2006) 101–112.
- [15] O. Aktas, N. Ari, M. Rieks, V. Hoffmann, S. Schimrigk, H. Przuntek, D. Pohlau, Multiple sclerosis: modulation of apoptosis susceptibility by glatiramer acetate, *Acta. Neurol. Scand.* 104 (2001) 266–270.
- [16] A. Prieto, E. Reyes, D. Díaz, M.P. Hernandez-Fuentes, J. Monserrat, E. Perucha, L. Muñoz, R. Vangioni, A. de la Hera, A. Orfao, M. Alvarez-Mon, A new method for the simultaneous analysis of growth and death of immunophenotypically defined cells in culture, *Cytometry* 39 (2000) 56–66.
- [17] I. Nicoletti, G. Migliorati, M.C. Pagliacci, F. Grignani, C. Riccardi, A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry, *J. Immunol. Methods* 139 (1991) 271–279.
- [18] M.K. Sharief, M.A. Noori, M.R. Douglas, Y.K. Semra, Upregulated survivin expression in activated T lymphocytes correlates with disease activity in multiple sclerosis, *Eur. J. Neurol.* 9 (2002) 503–510.
- [19] M.K. Sharief, M. Douglas, M. Noori, Y.K. Semra, The expression of pro- and anti-apoptosis Bcl-2 family proteins in lymphocytes from patients with multiple sclerosis, *J. Neuroimmunol.* 125 (2002) 155–162.
- [20] M.K. Sharief, Y.K. Semra, O.A. Seidi, Y. Zoukos, Interferon-beta therapy downregulates the anti-apoptosis protein FLIP in T cells from patients with multiple sclerosis, *J. Neuroimmunol.* 120 (2001) 199–207.
- [21] M.K. Sharief, M.A. Noori, Y. Zoukos, Reduced expression of the inhibitor of apoptosis proteins in T cells from patients with multiple sclerosis following interferon-beta therapy, *J. Neuroimmunol.* 129 (2002) 224–231.
- [22] P. Gniadek, O. Aktas, K.P. Wandinger, J. Bellmann-Strobl, O. Wengert, A. Weber, P. von Wussow, H.J. Obert, F. Zipp, Systemic IFN-beta treatment induces apoptosis of peripheral immune cells in MS patients, *J. Neuroimmunol.* 137 (2003) 187–196.
- [23] P. Marrack, J. Kappler, T. Mitchell, Type I interferons keep activated T cells alive, *J. Exp. Med.* 189 (1999) 521–530.
- [24] V.W. Yong, S. Chabot, O. Stuve, G. Williams, Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis: mechanisms of action, *Neurology* 51 (1998) 682–689.
- [25] G. Grondal, K.H. Traustadottir, H. Kristjansdottir, I. Lundberg, L. Klareskog, K. Erlendsson, K. Steinsson, Increased T-lymphocyte apoptosis/necrosis and IL-10 producing cells in patients and their spouses in Icelandic systemic lupus erythematosus multicausal families, *Lupus* 11 (2002) 435–442.
- [26] F. Silvestris, D. Grinello, M. Tucci, P. Cafforio, F. Dammacco, Enhancement of T cell apoptosis correlates with increased serum levels of soluble Fas (CD95/Apo-1) in active lupus, *Lupus* 12 (2003) 8–14.
- [27] M.P. Hernandez-Fuentes, E. Reyes, A. Prieto, A. Zea, L. Villa, A. Sanchez-Atrio, F. Esquivel, M. Alvarez-Mon, Defective proliferative response of T lymphocytes from patients with inactive systemic lupus erythematosus, *J. Rheumatol.* 26 (1999) 1518–1526.
- [28] J. Grzegorzczak, M.L. Kowalski, A. Pilat, J. Iwaszkiewicz, Increased apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with perennial allergic asthma/rhinitis: relation to serum markers of apoptosis, *Mediators Inflamm.* 11 (2002) 225–233.